



Sédation de longue durée par sévoflurane et AnaConDa® en réanimation : étude clinique et pharmacocinétique

Daniel Bourdeaux

► To cite this version:

Daniel Bourdeaux. Sédation de longue durée par sévoflurane et AnaConDa® en réanimation : étude clinique et pharmacocinétique. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2012. Français. NNT : 2012CLF1PP06 . tel-01167802

HAL Id: tel-01167802

<https://theses.hal.science/tel-01167802>

Submitted on 24 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Blaise Pascal

Année 2012

Université d'Auvergne

N° d'ordre :

***ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE***

N° d'ordre :

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
pour l'obtention du grade de Docteur

(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Pharmacie Clinique

Soutenue le mercredi 14 novembre 2012

BOURDEAUX Daniel

**Sédation de longue durée par sévoflurane et AnaConDa® en
réanimation: étude clinique et pharmacocinétique**

Jury :

Président : M. Jean-Etienne Bazin PU-PH Clermont-Ferrand

Membres : M. Jean Chopineau PU-PH Clermont-Ferrand, Directeur
Mme. Valérie Sautou MCU-PH Clermont-Ferrand, Directeur
M. Antoine Dupuis MCU-PH Poitiers

Rapporteurs: Mme. Marie-Claude Saux PU-PH Bordeaux
M. Gilles Aulagner PU-PH Lyon

Remerciements

Au Jury :

Monsieur le Professeur Jean-Etienne Bazin, Président

Pour m'avoir permis de réaliser ce travail en initiant ce projet et pour votre aide importante pour sa réalisation durant toutes ces années, soyez certain de ma plus grande gratitude et de ma respectueuse considération.

Monsieur le Professeur Jean Chopineau, Directeur

Pour votre rôle de conseil et d'encadrement tout au long de cette thèse mais aussi durant toute la durée de mon cursus hospitalo-universitaire. Merci de m'avoir donné la possibilité de réaliser mes projets au sein de votre laboratoire auquel je me sens maintenant très attaché. Pour tout cela, soyez assuré de ma plus grande reconnaissance et de mon profond respect.

Madame Valérie Sautou, Maître de Conférences, Directeur

Pour ton aide si précieuse pour la réalisation de cette thèse mais aussi dans tous les domaines au quotidien ainsi que pour le plaisir de travailler à tes côtés depuis longtemps maintenant. Merci pour tout, je t'accorde toute ma reconnaissance, mon amitié et tout mon respect pour l'exemple que tu représentes pour moi.

Monsieur Antoine Dupuis, Maître de Conférences

Vous me faites l'honneur de participer à ce Jury. L'apport de votre expertise dans le jugement de mon travail est pour moi source d'enrichissement et de progression pour la réalisation de mes futurs travaux de recherche. Soyez certain de ma plus profonde et respectueuse reconnaissance.

Madame le professeur Marie-Claude Saux, Rapporteur

C'est un grand honneur que vous me faites en participant à ce Jury. Merci pour les recommandations et remarques constructives formulées dans votre rapport. Veuillez accepter ma profonde et respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur Gilles Aulagner, Rapporteur

Votre participation dans mon Jury de Thèse est pour moi un grand honneur. J'apprécie également grandement toute la pertinence et ce qu'apportent à l'amélioration de mon travail vos remarques constructives formulées dans votre rapport. C'est avec un grand respect et une grande gratitude que je vous adresse ces remerciements.

Je tiens également à remercier toutes les personnes du service de Réanimation Adulte de l'Hôpital Estaing qui ont participé à ce travail et l'on rendu possible :

- Jean-Michel Constantin pour ta participation et tes conseils tout au long de cette thèse
- Sébastien Perbet pour ton implication importante depuis longtemps maintenant et pour encore longtemps je l'espère dans notre collaboration dans l'étude de l'utilisation des halogénés en réanimation.

- Tous les praticiens et infirmières qui ont par le passé réalisé les prélèvements et conditionné rigoureusement les échantillons à toute heure du jour et de la nuit pour la réalisation de l'étude !

A vous tous, soyez certain de ma profonde reconnaissance et de mon amitié.

J'aimerais aussi remercier énormément:

- Agnès Montagner, pour ta grande aide au début de ce travail et ton rôle décisif d'interface ainsi que pour ton amitié !
- Mes amis, David, Sophie, Pierre-Adelin, Céline et tous les autres pour tous les bons moments passés ensemble !
- Les techniciennes du laboratoire de contrôle, Françoise, Hélène et Marie-Thé pour le plaisir de travailler avec vous.

A ma famille (parents, grand-mère, frère, neveux, belle-sœur...) merci pour tout !

A ma femme et à mes deux belettes (et le chien) merci pour votre soutien au quotidien !

Table des matières

Introduction	2
Données Bibliographiques	4
1. Le sévoflurane	5
1.1. Historique	5
1.1.1. Avant les gaz halogénés	5
1.1.2. Les gaz halogénés	5
1.2. Caractéristiques physicochimiques.....	6
1.2.1. Structure chimique.....	6
1.2.1.1. La famille des halogénés	6
1.2.1.2. Particularités structurales du sévoflurane.....	6
1.2.2. Caractéristiques physiques	7
1.2.2.1. La solubilité, paramètre primordiale en clinique.....	7
1.2.2.2. Paramètres physicochimiques importants pour le développement de la méthode de dosage.....	9
1.3. Caractères organoleptiques.....	9
1.4. Mécanismes d'action, effets pharmacodynamiques	10
1.4.1. Cible pharmacologique.....	10
1.4.2. Concentration Alvéolaire Minimale du sévoflurane	10
1.4.3. Effet hypnotique	11
1.4.4. Effet analgésique	11
1.4.5. Effets cardiovasculaires	11
1.4.5.1. Au niveau périphérique	11
1.4.5.2. Au niveau cérébral	12
1.4.5.3. Au niveau cardiaque.....	12
1.4.6. Effets respiratoires	12
1.4.7. Effets musculaires.....	13

1.5.	Effets indésirables du sévoflurane	13
1.5.1.	Le plus grave : l'hyperthermie maligne des halogénés	13
1.5.2.	Autres effets indésirables.....	13
1.6.	Contre-indications	14
1.7.	Utilisation du sévoflurane.....	14
1.7.1.	Autorisation de mise sur le marché	14
1.7.2.	Modalités d'utilisation/posologies.....	14
1.7.2.1.	En induction de l'anesthésie.....	14
1.7.2.2.	En entretien de l'anesthésie	15
1.7.2.3.	En association avec le remifentanyl	15
1.7.3.	Administration en circuit ouvert ou circuit fermé ?	15
1.7.4.	AnaConDa	17
1.7.5.	Evaluation de la profondeur de sédation/anesthésie.....	17
1.7.6.	Evaluation de l'apport en gaz au patient	18
1.8.	Pharmacocinétique du sévoflurane	18
1.8.1.	Absorption	18
1.8.2.	Distribution dans les organes.....	18
1.8.3.	Métabolisme du sévoflurane.....	20
2.	Toxicité du sévoflurane	21
2.1.	Toxicité du principe actif.....	21
2.2.	Toxicité des métabolites et produits de dégradations	21
2.2.1.	Le composé A	21
2.2.2.	L'hexafluoroisopropanol	22
2.2.3.	Toxicité rénale des ions fluorures.....	23
2.3.	Toxicité potentielle lors d'une sédation de longue durée	23
3.	Anesthetic Conserving Device (ou ACD ou AnaConDa)	24
3.1.	Description technique	24
3.1.1.	Présentation du dispositif.....	24
3.1.2.	Positionnement du système dans le circuit de ventilation	25
3.1.3.	Fonctionnement du dispositif	26
3.1.3.1.	Autour du filtre AnaConDa.....	26
3.1.3.2.	Au niveau du filtre AnaConDa:.....	26
3.1.4.	Analyse de la teneur en gaz de l'air inspiré et expiré	27
3.1.5.	Réglage du dispositif	27

4.	La sédation de longue durée en réanimation par inhalation grâce à l'AnaConDa	28
4.1.	Objectifs de la sédation en réanimation.....	28
4.1.1.	Lutte contre la douleur.....	28
4.1.2.	Prévention des troubles neuropsychiques.....	29
4.1.3.	Amélioration de l'oxygénation tissulaire	29
4.2.	Pourquoi une sédation par inhalation plutôt que par voie intraveineuse ?	29
	Travail expérimental	31
1.	Déroulement de l'étude	32
1.1.	Rationnel de ce travail	32
1.2.	Les outils utilisés	33
1.2.1.	Quantification du sévoflurane et du HFIP	33
1.2.1.1.	Objectifs	33
1.2.1.2.	Revue de la littérature	34
1.2.1.3.	Spectrométrie de masse couplé à la chromatographie phase gazeuse avec injection headspace (HS/GC/MS) : description.....	35
1.2.2.	Dosage des fluorures par potentiométrie	39
1.2.3.	Validation des méthodes de dosage.....	39
1.2.4.	La modélisation pharmacocinétique	40
2.	Mise au point et optimisation du dosage plasmatique du sévoflurane et du HFIP	42
2.1.	Matériel et méthode	42
2.1.1.	Synthèse des solutions étalons.....	42
2.1.2.	Appareillage.....	43
2.1.3.	Optimisations chromatographiques	44
2.1.3.1.	Contraintes imposées par la nature des molécules dosées	44
2.1.3.2.	Optimisation par un plan d'expérience :	45
2.1.4.	Spectrométrie de masse	46
2.1.5.	Validation de la technique	46
2.1.5.1.	Spécificité.....	46
2.1.5.2.	Courbe d'étalonnage et linéarité	46
2.1.5.3.	Précision et exactitude.....	47
2.1.5.4.	Limite de quantification et de détection	47
2.1.6.	Définition du mode de prélèvement	47
2.1.7.	Premiers essais chez le patient de réanimation.....	49
2.1.1.	Analyse des résultats des dosages	49

2.2.	Résultats et discussion	49
2.2.1.	Résultats du plan d'expérience	49
2.2.2.	Validation de la méthode HS/GC/MS	51
2.2.2.1.	Spectrométrie de masse : sensibilité et spécificité	51
2.2.2.2.	Chromatogramme	52
2.2.2.3.	Rapidité d'analyse	53
2.2.2.4.	Répétabilité et fidélité intermédiaire	53
2.2.2.5.	Limites de quantification et de détection	54
2.2.3.	Choix du mode prélèvement	54
2.2.4.	Etude préliminaire	55
2.2.4.1.	Sévoflurane plasmatique	55
2.2.4.2.	HFIP plasmatique	56
2.3.	Conclusion sur la mise au point de la technique de dosage du sévoflurane et du HFIP	57
3.	Réalisation de l'essai clinique (Article 2)	58
3.1.	Objectifs de l'étude	58
3.1.1.	Objectifs primaires	58
3.1.2.	Objectifs secondaires	58
3.2.	Matériel et méthodes	58
3.2.1.	Recrutement des patients	59
3.2.1.1.	Critères d'inclusion	59
3.2.1.2.	Critères de non-inclusion	59
3.2.2.	Protocole anesthésique	60
3.2.3.	Protocole de prélèvement	61
3.2.4.	Nombre de patients inclus dans l'étude	62
3.2.5.	Dosage du sévoflurane du HFIP et des fluorures	62
3.2.5.1.	Dosage du sévoflurane et du HFIP	62
3.2.5.2.	Dosage des fluorures	63
3.2.6.	Suivi de la tolérance rénale	64
3.2.7.	Calcul des paramètres pharmacocinétiques	64
3.2.7.1.	Calcul des doses administrées	64
3.2.7.2.	Modélisation pharmacocinétique	64
3.3.	Résultats discussion	65
3.3.1.	Déroulement de l'étude	65
3.3.2.	Calcul de la quantité de sévoflurane absorbée par les patients	65

3.3.3. Cinétiques plasmatiques	66
3.3.4. Paramètres pharmacocinétiques	69
3.3.4.1. Choix du modèle pharmacocinétique	70
3.3.4.1. Paramètres pharmacocinétiques du modèle	71
3.3.5. Tolérance rénale	72
3.4. Conclusion sur l'essai clinique	73
Discussion générale et perspectives.....	75
1. Intérêt clinique de notre travail.....	76
2. Perspectives	77
Conclusion	79
Références bibliographiques.....	81
Communications sur le sujet	93
Publications internationales.....	95
Article 1	96
Article 2	103

Table des figures

Figure 1 : Chloroforme (trichloromethane)	5
Figure 2 : structures chimiques des anesthésiques halogénés commercialisés.....	6
Figure 3 : Chlorhydrate de rémifentanil	15
Figure 4 : Aperçu des circuits ouvert et fermé utilisés en anesthésie/réanimation.....	16
Figure 5 : positionnement de la chaux sodée dans le circuit fermé	16
Figure 6 : analogie hydraulique de Mapelson pour la distribution tissulaire des gaz d'anesthésie pour A : agent peu liposoluble et B : agent liposoluble ⁹	19
Figure 7 : schéma récapitulatif du métabolisme du sévoflurane	20
Figure 8 : fluorométhyl 2,2-difluoro-1-(trifluorométhyl)vinyl éther ou compound A.....	22
Figure 9 : Système AnaConDa	25
Figure 10 : Positionnement de l'AnaConDa dans le circuit de ventilation	25
Figure 11 : Evaluation de la teneur en gaz (%) en fonction du temps (secondes) pour l'isoflurane administré par AnaConDa	27
Figure 12 : abaque débit du pousse seringue en fonction de la ventilation minute	28
Figure 13 : Aperçu global du système HS/GC/MS	35
Figure 14 : principe de fonctionnement d'une injection headspace (espace de tête)	36
Figure 15 : Colonne capillaire installée dans un four et schémas descriptif d'une colonne.....	36
Figure 16 : schémas éclatés des composants du spectromètre de masse et trajectoire des ions dans le quadripôle.....	38
Figure 17 : décomposition du pic chromatographique en les différents ions qui le composent et comparaison de leurs abondances relatives avec les valeurs théoriques	38
Figure 18 : exemple de cinétique calculée par Kinetic Pro (ligne noire) avec les points expérimentaux en rouge. Modèle à 2 compartiments, erreur résiduelle de 10%.....	41
Figure 19 : allure globale de la courbe de température	44
Figure 20 : Diagramme de Pareto pour la réponse R3 sensibilité/limite de quantification	49
Figure 21 : courbe de température après optimisation.....	51
Figure 22 : ions choisis ainsi que leur abondance relative pour les 3 séquences SIM définies....	52
Figure 23 : Chromatogramme du sévoflurane, du HFIP et de leur étalon interne.....	52
Figure 24 : Profil pharmacocinétique du sévoflurane plasmatique. Moyennes (n=6) ± écart type	55
Figure 25 : Profil pharmacocinétique du HFIP libre plasmatique. Moyennes (n=6) ± écart type	56

Figure 26 : matérialisation graphique du protocole de prélèvement	61
Figure 27 : Profils pharmacocinétiques expérimentaux moyens du sévoflurane et du HFIP durant l'inhalation et jusqu'à 6 heures après l'arrêt.	66
Figure 28 : visualisation de la variabilité sur les cinétiques individuelles des 12 patients inclus	68
Figure 29 : décroissance de la Fe (en rouge) et des concentrations en sévoflurane (en bleue) après l'arrêt de l'inhalation.....	69
Figure 30 : copie d'écran du logiciel Kinetic Pro montrant l'adéquation entre le modèle pharmacocinétique calculé (trait noir) et les points expérimentaux (en rouge)	70
Figure 31 : Fluorures plasmatiques pendant la période d'inhalation.....	72
Figure 32 : évolution de l'urémie et la créatininémie après le début de l'inhalation	73

Table des tableaux

Tableau 1 : coefficients de partage sang/gaz (sans unité) de 3 gaz anesthésiques halogénés en fonction de la température	7
Tableau 2 : coefficients de partage sang/organe des anesthésiques halogénés commercialisés à 37°C	8
Tableau 3: température d'ébullition (°C) et tension de vapeur à saturation (mm Hg) du sévoflurane et du HFIP	9
Tableau 4 : valeurs de CAM en fonction de l'âge pour le sévoflurane, dans 100% d'O ₂	10
Tableau 5 : Comparaison des caractéristiques des circuits ouvert et fermé d'anesthésie	16
Tableau 6 : les différents niveaux de l'échelle de Richmond.....	17
Tableau 7 : exemples de travaux utilisant la chromatographie phase gazeuse pour quantifier le sévoflurane ou le HFIP	34
Tableau 8 : Propriétés physiques des solvants de dilutions.....	42
Tableau 9 : Concentrations des solutions mères permettant la réalisation des 5 étalons de la gamme plasmatique	43
Tableau 10 : conditions expérimentales des 8 essais du plan d'expérience	46
Tableau 11 : Valeurs des coefficients Pareto (en vert : les plus importants). Les coefficients inférieurs à 5% sont rendus non-significatifs (n.s.)	50
Tableau 12 : Valeurs des coefficients de variations et des exactitudes (écarts par rapport à la valeur théorique) calculés sur les essais de fidélité intermédiaire et de répétabilité	53
Tableau 13 : résultats des tests sur les matrices sang total et plasma.....	54
Tableau 14 : Valeurs des coefficients de variations et des exactitudes (écarts par rapport à la valeur théorique) calculés sur les essais de fidélité intermédiaire et de répétabilité pour le dosage des fluorures plasmatiques.....	63
Tableau 15 : quantité de sévoflurane moyenne absorbée par les patients (n=12). CV : Coefficient de Variation	65
Tableau 16 : paramètres pharmacocinétiques du modèle.....	71

Liste des abréviations

- AIVOC : Anesthésie Intra-Veineuse à Objectif de Concentration
- AnaConDa : Anaesthetic Conservating Device
- ANOVA : analyse de variance
- BMI : Body Mass Index : Indice de Masse Corporelle
- BPS : Behavioral Pain Score : score de douleur comportementale
- CAM Concentration Alvéolaire Minimale
- Cl_{pl} : clairance plasmatique
- Fe: Fraction expirée en sévoflurane
- FID : Flame Ionization Detector : Détecteur à Ionisation de Flame
- GABA : Acide Gamma Amino Butyrique
- HFIP : Hydroxy-Fluoro-Iso-Propanol
- HS : Head-Space : injection à espace de tête
- $K_{1,2}$ et $K_{2,1}$: constantes pharmacocinétiques de transfert inter-compartimentales
- K_a : constante d'absorption
- K_{el} : constante d'élimination
- MS : Mass Spectrometry : Spectrométrie de Masse
- N55 : pureté de gaz supérieure à 99,9995 %
- NGAL: Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
- P_{CO_2} : Pression partielle sanguine en dioxyde de carbone
- ppb : partie par billion : $\mu g/l$
- SIM : Single Ion Monitoring
- $T_{1/2}$: temps de demi-vie d'élimination
- V_d : volume de Distribution

Introduction

En réanimation ou en anesthésie, la sédation est toujours basée sur l'association de deux classes médicamenteuses : les hypnotiques (benzodiazépines, propofol, gaz halogénés) et les morphiniques (morphine, fentanyl, sufentanil et rémifentanil).

Le praticien en anesthésie-réanimation a donc à sa disposition plusieurs types de médicaments qui agissent en synergie. Pour la catégorie des hypnotiques, l'utilisation des gaz halogénés était, jusqu'au début des années 2000 surtout développée pour les protocoles d'anesthésie. En effet, le matériel disponible pour la sédation (évaporateur, circuit ouvert ou fermé...) ne permettait pas l'administration des faibles quantités de gaz nécessaire à la réalisation d'une sédation.

L'intérêt grandissant pour les propriétés particulières des gaz halogénés a stimulé le développement de dispositifs médicaux tels que l'Anaesthetic Conserving Device (AnaConDa ou ACD). Ce dispositif se substitue à l'échangeur de chaleur et d'humidité sur le circuit respiratoire. Il recycle en grande partie le gaz inhalé rendant possible le développement de protocoles de sédation utilisant les gaz halogénés à de faibles doses sur des périodes beaucoup plus longues que celles pour lesquelles ces produits ont été développés initialement. Parmi eux, le sévoflurane présente des caractéristiques séduisantes par rapport aux molécules utilisées en intraveineuse (propofol par exemple) : faible volume de distribution, élimination et réveil rapides à l'arrêt de l'inhalation, protection cardio-vasculaire. Utilisé avec le rémifentanil qui possède également ces caractéristiques pharmacologiques, le sévoflurane a montré son efficacité en sédation. L'utilisation du système AnaConDa a également apporté au praticien et au patient un confort supplémentaire dans cette indication.

Cependant, l'Autorisation de Mise sur le Marché du sévoflurane a été obtenue en anesthésie, pour des protocoles ne dépassant pas 9 heures d'inhalation. Peu de données bibliographiques existent sur l'influence d'une telle durée d'utilisation sur le métabolisme du sévoflurane et son devenir dans le sang des patients. L'étude pharmacocinétique de l'administration de ce gaz sur des périodes beaucoup plus longues est donc nécessaire afin d'envisager le développement de l'utilisation de ce gaz à plus grande échelle au moyen de l'AnaConDa.

Ainsi, nous avons étudié l'administration du sévoflurane lors de protocoles de sédation de 48 h, tant sur le versant clinique avec l'évaluation de la tolérance au traitement chez les patients de réanimation que sur le versant pharmacocinétique en décrivant le modèle le plus adapté. L'évaluation de ces paramètres apportera une meilleure connaissance du comportement du sévoflurane et une sécurité supplémentaire pour le patient de réanimation sédaté par ce type de protocole.

Données Bibliographiques

1. Le sévoflurane

1.1. Historique

1.1.1. Avant les gaz halogénés

Le protoxyde d'azote (N_2O) est le premier gaz qui a démontré un effet anesthésique sur le patient grâce aux travaux d'un pharmacien, Humphry Davy, en 1799 ¹. La découverte de l'éther a suivi en 1818 par Mickael Faraday, préparateur en pharmacie, qui découvrit les propriétés narcotiques des vapeurs d'éther dont l'usage se développe dans le monde et en particulier en France à partir de 1847.

1.1.2. Les gaz halogénés

Les gaz halogénés tiennent leur appellation de la présence d'atome du groupe des halogènes dans la structure de la molécule. A ce titre le premier représentant de ce type de médicament est le chloroforme (**Figure 1**) :

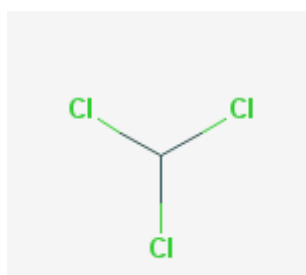


Figure 1 : Chloroforme (trichloromethane)

Cette molécule, plus volatile et agréable que l'éther, a supplanté celui-ci à partir de la deuxième moitié du 19^{ème} siècle.

Mais aujourd'hui, le terme gaz halogénés désigne une classe de molécules dont fait partie le méthoxyfurane (utilisation abandonnée dans les années 70 du fait de sa toxicité rénale), chef de fil d'une série de molécules que sont : l'enflurane (AMM 1974), l'halothane (AMM 1977), l'isoflurane (AMM 1984), le desflurane (AMM 1994), et le sévoflurane (AMM 1995). De nos jours, seuls l'isoflurane, le desflurane et le sévoflurane sont commercialisés en France.

La première étude clinique chez le volontaire sain sur le sévoflurane remonte à 1981 par Holaday *et al* ². Son utilisation s'est ensuite développée en France à partir de 1995 avec

l'obtention de l'AMM française pour la spécialité SEVORANE[®] commercialisée par le laboratoire Abbott.

1.2. Caractéristiques physicochimiques

1.2.1. Structure chimique

1.2.1.1. La famille des halogénés

Les anesthésiques halogénés sont des molécules comportant un squelette carboné, plusieurs atomes d'halogènes (Fluor, Chlore ou Brome) et souvent une fonction éther. Leur poids moléculaire va de 168 g/mol pour le desflurane à 200 g/mol pour le sévoflurane et leurs structures développées sont présentées **Figure 2**.



Figure 2 : structures chimiques des anesthésiques halogénés commercialisés

1.2.1.2. Particularités structurales du sévoflurane

De formule brute $C_4H_3F_7O$ le sévoflurane (ou Hexafluoro-1,1,1,3,3,3 fluorométhoxy-2-propane) est l'halogéné de plus haut poids moléculaire. Contrairement aux autres halogénés commercialisés et comme le méthoxyflurane, la molécule du sévoflurane ne possède aucun carbone asymétrique. En effet il a été démontré par Aboul-Enein *et al*³ une influence de la chiralité des autres halogénés sur les propriétés anesthésiques de ces gaz, certains mécanismes d'action de ceux-ci étant énantiosélectifs. Pour le sévoflurane il n'y a donc pas de variabilité de ce type ce qui lui confère théoriquement une moindre variabilité d'action.

1.2.2. Caractéristiques physiques

1.2.2.1. La solubilité, paramètre primordiale en clinique

Les caractéristiques physiques des gaz halogénés, en particulier celles liées à la solubilité dans le sang ou les organes sont déterminantes pour l'utilisation de ces médicaments : en effet, il a été démontré que la solubilité des gaz dans le plasma est inversement corrélée à la vitesse d'action et d'élimination de ces produits. Ainsi, un gaz d'anesthésie peu soluble permettra une induction rapide de l'anesthésie ou de la sédation et sera rapidement éliminé à l'arrêt de l'inhalation d'où un réveil rapide. La solubilité est estimée par le calcul du coefficient de partage gaz/sang selon l'**Équation 1** :

$$\lambda = Cl(Vg/Vl)/(Cg - Cl)$$

λ : coefficient de partage

Cl : concentration sanguine

Cg : concentration de la phase gazeuse

Vg : volume de la phase gazeuse

Vl : Volume sanguin

Équation 1 : calcul du coefficient de partage d'un gaz entre la phase liquide et la phase gazeuse de celui-ci

Le coefficient de partage gaz/sang est donc le paramètre le plus décisif quant à la rapidité d'action du gaz et la rapidité de réveil des patients. Le **Tableau 1** expose les valeurs des coefficients de partage sang/gaz en fonction de la température pour les 3 halogénés encore commercialisés selon Yang *et al* ⁴. D'autres auteurs ont recherché ce coefficient pour le sévoflurane et concluent à des valeurs allant de 0.60 pour Wallin *et al* ⁵ à 0.69 pour Strum *et al* ⁶ mais la valeur la plus communément admise dans la littérature est 0.65 à 37°C.

	Températures		
	4°C	25°C	37°C
isoflurane	6,68	2,04	1,32
Sévoflurane	3,47	1,1	0,65
Desflurane	2,31	0,75	0,46

Tableau 1 : coefficients de partage sang/gaz (sans unité) de 3 gaz anesthésiques halogénés en fonction de la température

Le coefficient de partage est inversement proportionnel à la température : à 37°C il est minimal ce qui implique, lors de la réalisation de prélèvement en vue d'un dosage, de les conditionner en milieu réfrigéré pour limiter la perte du gaz par évaporation. En effet, il a été déterminé une augmentation de 4% de ce coefficient par degré de diminution de température ⁷, ce qui pour une température réfrigérée de 4°C donne un coefficient de partage de 1.97. Ceci est très en faveur de la dissolution du sévoflurane gazeux dans le sang et donc limite cette perte potentielle.

Des trois gaz commercialisés de nos jours en France, le desflurane est celui qui a le plus faible coefficient de partage Sang/Gaz. Néanmoins, ce qui pourrait être un avantage contre-indique l'utilisation de ce gaz avec le système AnaConDa (description du dispositif dans le paragraphe 3): la trop forte volatilité de ce gaz entraîne l'absence de rétention de cette molécule au niveau du filtre du dispositif. La plus faible volatilité du sévoflurane permet par contre une rétention de 90% du gaz lors de l'expiration du patient sur le filtre ce qui garantit un recyclage efficace de l'halogéné ⁸.

On peut également définir, comme le décrit Odin *et al* ⁹ des coefficients de partage des halogénés entre le sang et les différents organes des patients à 37°C. Le **Tableau 2** expose ces valeurs.

	Sang-cerveau	Sang-muscle	Sang-graisse
Isoflurane	1,57	2,92	52
Sévoflurane	1,29	2,02	30
Desflurane	1,7	3,13	55

Tableau 2 : coefficients de partage sang/organe des anesthésiques halogénés commercialisés à 37°C

Les coefficients de partage sont supérieurs à 2 ce qui met en évidence le faible passage relatif des composés dans les différents organes. Un passage existe néanmoins et pourrait notamment être augmenté lors de durées de traitement prolongées et ainsi diminuer la vitesse d'élimination des produits. L'étude de la pharmacocinétique du produit est donc nécessaire dans le développement d'une telle utilisation.

1.2.2.2. Paramètres physicochimiques importants pour le développement de la méthode de dosage

D'autres paramètres physicochimiques de moindre importance en clinique ont un intérêt majeur pour le dosage des molécules par technique chromatographique, méthode analytique que nous avons développée (paragraphe 1.2.1.). En effet, cette méthode requiert la vaporisation des analytes d'où l'importance des paramètres inhérents à la capacité des molécules à se vaporiser : température d'ébullition et tension de vapeur à saturation. Le **Tableau 3** présente ces 2 paramètres pour les molécules d'intérêt dans notre étude, à savoir le sévoflurane et son métabolite principal l'hexafluoroisopropanol (HFIP voir chapitre 1.8.3).

	température d'ébullition (°C)	tension de vapeur à saturation à 20°C (mm Hg)
Sévoflurane	58,6	157
HFIP	58	102

Tableau 3: température d'ébullition (°C) et tension de vapeur à saturation (mm Hg) du sévoflurane et du HFIP

Les 2 composés sont donc très volatiles et possèdent des températures d'ébullition relativement faibles ceci désignant la chromatographie en phase gazeuse comme technique de choix pour leur dosage dans une matrice plasmatique. De plus, ces deux paramètres sont proches ce qui simplifie le développement d'une technique de dosage unique pour ces 2 molécules.

1.3. Caractères organoleptiques

Les caractères organoleptiques acceptables des agents halogénés font que cette voie est souvent préférée chez les patients peu compliants tels que les enfants. En effet ceux-ci peuvent parfois refuser les injections nécessaires à une anesthésie et préfèrent souvent que celle-ci soit réalisée par inhalation. Or, le sévoflurane à la différence du desflurane et de l'isoflurane présente une bonne acceptation par les patients du fait de l'absence d'âcreté. C'est pourquoi ce gaz est particulièrement utilisé en anesthésie pédiatrique.

1.4. Mécanismes d'action, effets pharmacodynamiques

1.4.1. Cible pharmacologique

C'est une question qui encore de nos jours est sujette à controverse. Néanmoins, les travaux d'Alkire *et al* en 2000 ont montré par tomographie à émission de positons et imagerie par résonance magnétique, que l'activité du thalamus et de la formation réticulée était modifiée par les halogénés ¹⁰ laissant entendre que ces parties du cerveau seraient le siège de l'action de ces médicaments.

Au niveau neuronal, les halogénés ont montré *in vitro* un effet inhibiteur sur les transmissions synaptiques médullaires et à plus forte dose sur la transmission axonale de l'influx nerveux ^{11,12}. Cet effet passerait par une diminution de libération de catécholamines et de glutamate au niveau synaptique (effet démontré *in vitro* par Eilers *et al* ¹³ sur des cellules cérébrales de rat). Une potentialisation de l'effet inhibiteur du GABA (Acide Gamma Amino Butyrique) a également été démontrée par Antkowiak *et al* ¹⁴ sur des cellules de rats *in vitro*. Les halogénés et en particulier le sévoflurane stimulent donc les voies inhibitrices et inhibent les voies excitatrices au niveau de la substance réticulée et du thalamus.

1.4.2. Concentration Alvéolaire Minimale du sévoflurane

La Concentration Alvéolaire Minimale ou CAM (MAC en Anglais) correspond à la concentration alvéolaire minimale nécessaire exprimée en pourcentage volumique de sévoflurane dans les gaz de dilution pour que 50% des patients n'aient pas de réaction motrice à l'incision chirurgicale. Cette valeur diminue avec l'âge et est plus faible en mélange oxygène/protoxyde d'azote (35%/65%) comme le montrent les valeurs du **Tableau 4**.

Age du patient	Sévoflurane dans 100 % d'O ₂	Sévoflurane dans 65 % N ₂ O/35 % O ₂
0-1 mois*	3,3 %	
1-< 6 mois	3,0 %	
6 mois-< 3 ans	2,8 %	2,0 %
3-12 ans	2,5 %	
25 ans	2,6 %	1,4 %
40 ans	2,05 %	1,1 %
60 ans	1,7 %	0,9 %
80 ans	1,4 %	0,7 %

Tableau 4 : valeurs de CAM en fonction de l'âge pour le sévoflurane, dans 100% d'O₂

Ainsi la CAM d'un gaz d'anesthésie constitue l'unité posologique utilisée pour prescrire une anesthésie : plus l'anesthésie souhaitée est profonde, plus l'anesthésiste prescrit une valeur de CAM importante. Le geste chirurgical effectué est donc un critère de choix de la CAM.

En pratique clinique, C'est plutôt la CAM95 qui est utilisée. Elle correspond à la concentration alvéolaire minimale nécessaire exprimée en pourcentage volumique de sévoflurane dans les gaz de dilution pour que 95% des patients n'aient pas de réaction motrice à l'incision chirurgicale. Cette CAM95 correspond généralement à 1.2 à 1.3 CAM. Nous pouvons également citer la CAM de réveil (0.3 CAM) ou la CAM-BAR qui est celle qui bloque la réponse hémodynamique à l'intubation.

1.4.3. Effet hypnotique

C'est le premier effet recherché lors de l'administration du sévoflurane. Il découle d'une part de la stimulation du système GABAergique et de l'autre de la diminution d'activité des systèmes excitateurs induits par l'halogéné. Cet effet est quantifié par la CAM qui donne une idée de la puissance hypnotique du gaz utilisé.

1.4.4. Effet analgésique

Le sévoflurane n'a pas à proprement parler d'effet analgésique. Au contraire, à la concentration de 0.1 CAM, le sévoflurane aurait même un effet hyperalgésique ¹⁵. Néanmoins, il existe une synergie d'action entre morphiniques et halogénés car il existe une diminution de la CAM lors de l'association de ces deux types de produits par rapport à la CAM lors de l'utilisation d'halogéné seul.

1.4.5. Effets cardiovasculaires

1.4.5.1. Au niveau périphérique

De par l'inhibition des systèmes baroréflexes, le sévoflurane comme tous les halogénés a un effet vasodilatateur périphérique qui parfois peut justifier l'emploi d'amines vaso-actives pour corriger la chute de pression qui peut en découler. Cette vasodilatation est plus marquée pour l'isoflurane et le sévoflurane que pour le desflurane.

1.4.5.2. Au niveau cérébral

Un effet de diminution de la régulation du débit sanguin associé aux variations de la PaCO_2 est observé lors d'utilisation du sévoflurane. Nous observons néanmoins que les anciens halogénés (halothane et enflurane) étaient plus enclins à ce phénomène : ainsi Nishiyama *et al*¹⁶ ont montré en 1997 que le débit cérébral était conservé lors d'administration de sévoflurane à la dose de 2 CAM contre seulement 1 CAM pour enflurane et halothane¹⁷.

Par ailleurs, associé au N_2O , le sévoflurane augmente le débit sanguin cérébral, ce qui peut entraîner une augmentation de la pression intracrânienne¹⁸. Cette augmentation est compensée par le pouvoir d'expansion du cerveau du sujet sain mais contre-indique l'utilisation d'halogénés en cas d'hypertension intracrânienne préexistante.

Les halogénés et en particulier le sévoflurane sont également considérés comme des neuroprotecteurs cérébraux dans la mesure où ils diminuent la consommation cérébrale de glucose et d'oxygène^{19,20}. Bien qu'*in vitro* cet effet ait été démontré par une moindre extension des lésions induites par l'ischémie, il est difficile de le mettre en évidence en clinique⁹.

1.4.5.3. Au niveau cardiaque

Les halogénés possèdent un effet inotrope négatif mais qui n'affecte pas le débit cardiaque du fait de la vasodilatation périphérique qui diminue la postcharge. Au-dessus de 1.5 CAM nous pouvons par contre observer une tachycardie réflexe chez les personnes dont le baroréflexe n'est pas aboli (sujets jeunes par exemple). Sous halogénés une vasodilatation coronaire est également constatée.

1.4.6. Effets respiratoires

A faible dose (dès 0.1CAM), un effet d'altération de réponse à l'hypoxie et à l'hypercapnie est présent. Au-delà de 1.1 CAM d'halogéné, cet effet est aboli. Parmi les halogénés, c'est pour le sévoflurane que cet effet dépresseur respiratoire est le moins marqué. Un effet bronchodilatateur est également observé avec diverses intensités selon les gaz. Le desflurane semblerait être moins bronchodilatateur que le sévoflurane du fait d'un effet irritant sur les voies respiratoires que le sévoflurane n'a pas.

1.4.7. Effets musculaires

Globalement, le sévoflurane comme tous les halogénés sont des relaxants musculaires. Cet effet passe pour partie à l'inhibition des neurones moteurs spinaux ²¹. De ce fait, ce relâchement musculaire participe à l'immobilité chirurgicale d'autant plus que l'on observe une potentialisation de l'effet des curares pouvant être co-administrés.

1.5. Effets indésirables du sévoflurane

Le sévoflurane présente comme tous les halogénés un profil de tolérance très bon.

1.5.1. Le plus grave : l'hyperthermie maligne des halogénés

C'est un effet indésirable grave redouté car il peut mettre en jeu le pronostic vital. Heureusement, sa fréquence de survenue est de 1/200.000 anesthésie et il existe un antidote spécifique (dandrolène DANTRIUM®).

C'est une maladie autosomale dominante dérivant d'une anomalie des canaux calciques musculaires (c'est donc une maladie familiale). Le réticulum sarcoplasmique libère massivement du calcium qui n'est pas recapturé ce qui déclenche une contraction musculaire anormale et durable entraînant l'hyperthermie par production de chaleur et un épuisement des réserves d'ATP.

Cliniquement, le patient touché présente donc une forte rigidité musculaire avec une température supérieure à 40, une hypercapnie déclenchant une acidose par augmentation de la P_{CO_2} (>45mm de Hg). Une rhabdomyolyse plus ou moins importante apparaît ainsi qu'une hyperkaliémie pouvant engendrer une arythmie ventriculaire si rien n'est fait.

La mort survient dans 3% des cas.

Le nombre limité de cas d'hyperthermie maligne survenant aujourd'hui provient d'une meilleure connaissance et formation des praticiens à ce sujet.

1.5.2. Autres effets indésirables

De par son mécanisme d'action inhibiteur, les halogénés et en particulier le sévoflurane entraînent différents types d'effets indésirables :

- Baisse de la tension artérielle dose dépendante. Elle peut parfois nécessiter l'injection d'amines vasoactives (dopamine ou noradrenaline)
- Nausées-vomissements post opératoire
- Toux

- Modifications de la concentration de fluor sérique inorganique
- Episodes convulsifs transitoires et résolutifs
- Exceptionnels rashes cutanés
- Exceptionnels cas d'hépatite cytolytique

1.6. Contre-indications

Le sévoflurane présente peu de contre-indications. Nous pouvons néanmoins citer les antécédents personnels ou familiaux d'hyperthermie maligne et les hypersensibilités aux agents anesthésiques halogénés.

L'utilisation du sévoflurane est néanmoins déconseillée chez certaines catégories de patients comme par exemple les patients ayant eu d'autres types d'hyperthermie maligne comme l'hyperthermie maligne d'effort.

1.7. Utilisation du sévoflurane

1.7.1. Autorisation de mise sur le marché

La seule indication existante dans le résumé des caractéristiques du produit est «anesthésie générale par inhalation, utilisable en induction et entretien, pour les patients hospitalisés ou ambulatoires, chez l'adulte et chez l'enfant». La sédation grâce au sévoflurane en réanimation ne fait pas partie des indications officielles du produit. Néanmoins des études cliniques existent en particulier avec l'AnaConDa et seront décrits dans la partie expérimentale de ce travail.

1.7.2. Modalités d'utilisation/posologies

Le sévoflurane n'est pas inhalé pur mais en mélange avec l'oxygène pur (O₂), ou avec le protoxyde d'azote (N₂O) et l'oxygène (O₂).

1.7.2.1. En induction de l'anesthésie

En mélange avec l'air ou avec NO₂/O₂, le sévoflurane permet une induction rapide de l'anesthésie. Des concentrations maximales inspirées de sévoflurane de 8% produisent habituellement une anesthésie suffisamment profonde pour réaliser un acte chirurgical en moins de 2 minutes chez l'adulte et l'enfant. Pour les patients plus âgés, des concentrations inférieures peuvent suffire.

1.7.2.2. En entretien de l'anesthésie

En fonction de la profondeur d'anesthésie désirée, des concentrations allant de 0.5 à 3% sont nécessaires, parfois moins chez les patients plus âgés.

1.7.2.3. En association avec le remifentanyl

Tout protocole d'anesthésie-réanimation associe pour l'analgésie du patient un morphinique à l'hypnotique utilisé. Parmi les molécules présentes sur le marché, le rémifentanyl (**Figure 3**) commercialisé sous le nom d'ULTIVA[®] (Glaxosmithkline) présente des caractéristiques intéressantes. En effet, c'est un morphinique de brève durée d'action utilisé en anesthésie et réanimation qui possède des propriétés pharmacocinétiques compatibles avec son utilisation avec le sévoflurane : Muellejans *et al*²² a démontré l'intérêt de l'utilisation de ce morphinique quant à la diminution du temps entre l'arrêt de la sédation et l'extubation par rapport au fentanyl: sa demi-vie très courte et son volume de distribution très faible font de l'association rémifentanyl (ULTIVA[®])/sévoflurane un outil particulièrement efficace pour surveiller et réveiller les patients en réanimation du fait de la cinétique très rapide des 2 molécules.

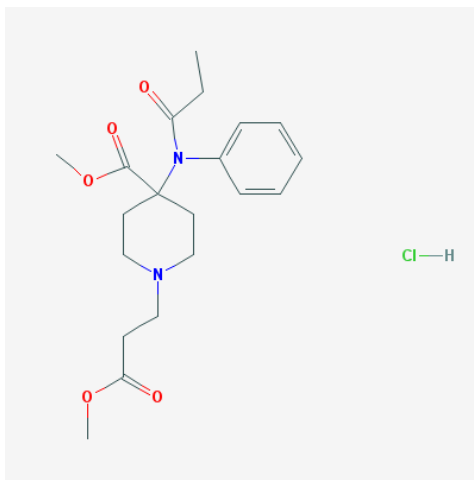


Figure 3 : Chlorhydrate de rémifentanyl

L'association sévoflurane/rémifentanyl est utilisée en routine, y compris avec le système AnaConDa. C'est cette pratique que nous avons adoptée lors de notre étude clinique.

1.7.3. Administration en circuit ouvert ou circuit fermé ?

Classiquement en anesthésie, deux types de montage pour administrer les halogénés sont utilisés (**Figure 4**).

- Le circuit ouvert ou circuit à haut débit de gaz frais
- Le circuit fermé ou semi-fermé à bas débit de gaz frais

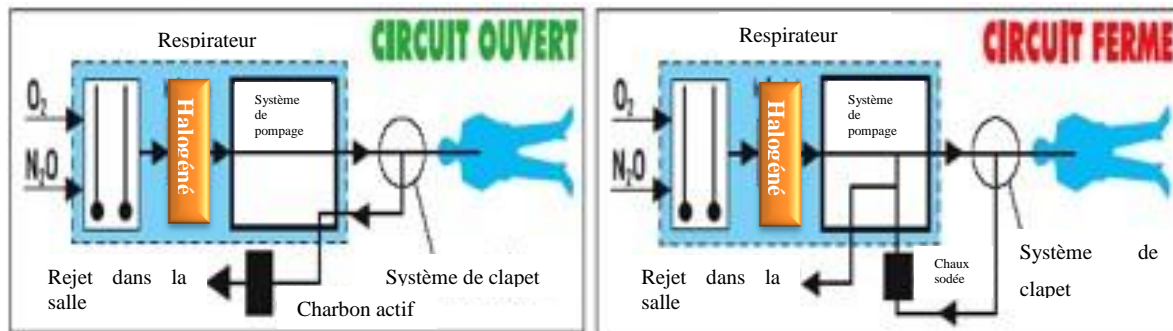


Figure 4 : Aperçu des circuits ouvert et fermé utilisés en anesthésie/réanimation

Chaque système présente des caractéristiques propres comme exposé dans le **Tableau 5**

	coût de l'équipement	complexité du montage	débit de gaz frais	précision sur la composition du mélange	coût en halogéné	pollution de l'environnement
circuit ouvert	faible	faible	élevé	élevée	élevé	oui
circuit fermé	élevé	élevée	faible	faible	faible	non

Tableau 5 : Comparaison des caractéristiques des circuits ouvert et fermé d'anesthésie

L'étude de coût dans le choix d'un nouveau système devra prendre en compte le coût d'investissement du matériel mais aussi le consommable et la consommation en gaz.

L'aspect pollution de l'environnement et exposition du personnel soignant est également important : des travaux ont montré que les anesthésistes exposés à de faibles concentrations en sévoflurane présentaient des modifications chromosomiques^{23,24}.

Enfin la chaux sodée présente dans le circuit fermé (**Figure 5**) pour supprimer le dioxyde de carbone exhalé par le patient a l'inconvénient d'interagir avec le sévoflurane pour former le « compound A » potentiellement néphrotoxique (toxicité détaillée en 2.2.1)

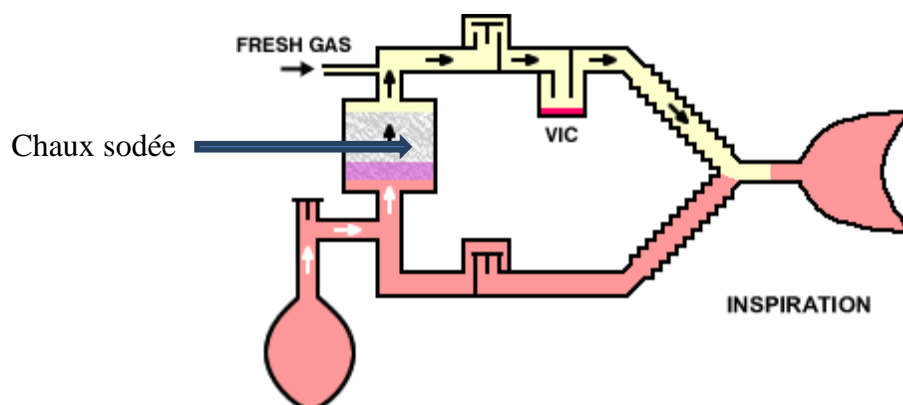


Figure 5 : positionnement de la chaux sodée dans le circuit fermé

1.7.4. AnaConDa

Le système AnaConDa ou Anesthetic Conserving Device présente une évolution dans l'administration des halogénés dans la mesure où il permet de combiner les avantages des deux systèmes traditionnels. En effet, ce dispositif détaillé dans le paragraphe 3 de cette partie bibliographique permet l'administration d'un faible débit d'halogéné sans nécessité de chaux sodée avec un surcoût moindre car connecté à un respirateur classique et une pollution de l'environnement maîtrisée.

1.7.5. Evaluation de la profondeur de sédation/anesthésie

L'évaluation de la profondeur de sédation permet l'optimisation du traitement du patient en adaptant sa posologie en fonction de l'effet recherché. De plus, cette surveillance permet d'éviter le risque de surdosage et permet également de réguler au plus juste la consommation de gaz. Nous avons réalisé une telle surveillance lors de notre étude.

Il existe de nombreuses échelles publiées pour le monitoring de la profondeur de sédation mais seulement certaines semblent avoir prouvé leur fiabilité. Ainsi, en 2000 De Jonghe *et al*²⁵ ont étudié la pertinence de 25 échelles et déterminé que seules 4 étaient fiables (échelles de Ramsay, de sédation agitation, d'activité motrice, et Comfort)

On peut également citer l'échelle d'agitation sédation de Richmond (Richmond Agitation-Sedation Scale ou RASS), non étudiée par Jonghe *et al* car d'apparition ultérieure à leur étude, qui semble également performante²⁶.

Dans notre étude clinique la sédation des patients a été évaluée grâce à l'échelle de Richmond dont le **Tableau 6** en détaille la cotation en Français²⁷ :

Niveau	Description	Définition
+ 4	Combatif	Combatif, danger immédiat envers l'équipe.
+ 3	Très agité	Tire, arrache tuyaux ou cathéters et/ou agressif envers l'équipe.
+ 2	Agité	Mouvements fréquents sans but précis et/ou désadaptation au respirateur
+ 1	Ne tient pas en place	Anxieux ou craintif, mais mouvements orientés, peu fréquents, non vigoureux, non agressif.
0	Éveillé et calme	
- 1	Somnolent	Pas complètement éveillé, mais reste éveillé avec contact visuel à l'appel (> 10s).
- 2	Diminution légère de la vigilance	Reste éveillé brièvement avec contact visuel à l'appel (< 10s).
- 3	Diminution modérée de la vigilance	N'importe quel mouvement à l'appel (ex: ouverture des yeux), mais pas de contact visuel.
- 4	Diminution profonde de la vigilance	Aucun mouvement à l'appel, n'importe quel mouvement à la stimulation physique (friction non nociceptive de l'épaule ou du sternum).
- 5	Non réveillable	Aucun mouvement, ni à l'appel, ni à la stimulation physique (friction non nociceptive de l'épaule ou du sternum).

Tableau 6 : les différents niveaux de l'échelle de Richmond²⁷

La réalisation de l'évaluation est simple :

L'investigateur entre dans la chambre du patient et s'adresse à lui en le saluant s'il est éveillé et s'entretient brièvement avec lui. Si le patient n'est pas éveillé, l'investigateur s'adresse à lui avec une voix de plus en plus forte, et lui demandant d'ouvrir les yeux et de le regarder.

En l'absence de réponse, l'investigateur secoue l'épaule du patient puis, en l'absence de réponse, lui frictionne le sternum, sans lui occasionner de douleur (stimulations physiques non nociceptives).

1.7.6. Evaluation de l'apport en gaz au patient

Il est important, lors de l'utilisation d'un halogéné, de vérifier que l'apport en médicament correspond aux valeurs cibles que l'on s'est fixées. Pour ce faire, les circuits d'anesthésies sont dotés de systèmes d'analyse infrarouge en temps réel qui donnent le pourcentage volumique en gaz dans l'air expiré par le patient. L'AnaConDa possède également un port permettant cette analyse (voir paragraphe 3.1). Cette valeur est utilisée pour le réglage du système car elle est une approximation de la concentration plasmatique en gaz chez le patient ²⁸.

1.8. Pharmacocinétique du sévoflurane

1.8.1. Absorption

L'absorption du sévoflurane se fait à travers la membrane de l'alvéole pulmonaire. Elle est rapide et l'on détecte le sévoflurane dans l'air expiré du patient et le sang du patient en quelques minutes lors de l'administration avec l'AnaConDa²⁹. Néanmoins avec l'AnaConDa, du fait de l'élimination pulmonaire du produit, il est difficile de faire la part des choses entre le sévoflurane non absorbé et le sévoflurane éliminé par voie pulmonaire (reflet de la concentration plasmatique de l'anesthésique). En effet, ces deux fractions sont exhalées et re-inhalées conjointement (voir paragraphe 3.1) et seul le dosage plasmatique peut permettre de connaître avec précision la concentration réelle sanguine du produit.

1.8.2. Distribution dans les organes

Dans les années 60, Mapelson a décrit par une analogie hydraulique le devenir des anesthésiques inhalés dans le corps des patients. Il résume en fait la distribution de ces molécules inhalées par des transferts entre 5 compartiments de tailles variables (**Figure 6**).

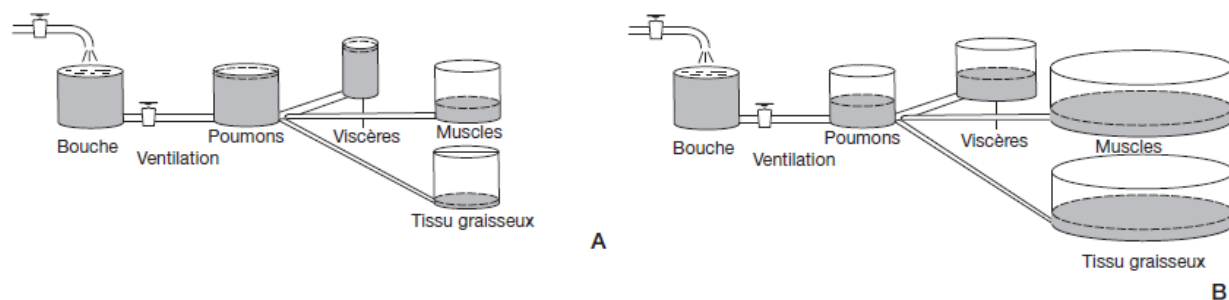


Figure 6 : analogie hydraulique de Mapelson pour la distribution tissulaire des gaz d'anesthésie pour A : agent peu liposoluble et B : agent liposoluble ⁹

On voit ici qu'une molécule liposoluble comme le sévoflurane aura une propension à diffuser dans les tissus graisseux retardant par la même l'élimination du produit.

On peut distinguer 3 groupes d'organes ⁹:

- Organes richement vascularisés : faible volume de distribution mais fort débit sanguin (cœur, cerveau, rein ou foie)
- Groupe muscle/peau : d'un volume supérieur mais de moindre vascularisation
- Compartiment profond : composé par le tissu graisseux, il est peu vascularisé

Le sévoflurane passe donc d'abord l'alvéole pulmonaire pour arriver dans le sang puis est transféré vers les organes richement vascularisés puis vers les muscles et la peau, et enfin vers le tissu graisseux.

Une longue utilisation du gaz pourrait entraîner une plus forte imprégnation du corps du patient en particulier des tissus graisseux et donc un plus long réveil lors de l'arrêt de l'inhalation dû à une élimination moins rapide du produit. Notre travail a pour but entre autres d'évaluer l'influence d'une longue durée d'administration sur ce paramètre.

Plus particulièrement, la distribution du gaz dans les organes cibles (thalamus et de la formation réticulée comme vu précédemment dans le paragraphe 1.4.1), a été étudiée par certains auteurs : Nakamura *et al* ³⁰ et Lu *et al* ³¹ ont étudié sur de courtes périodes l'évolution des concentrations de sévoflurane dans le cerveau en mesurant les concentrations plasmatiques de ce gaz au niveau jugulaire et ont montré qu'il fallait environ 40 minutes pour que les concentrations s'équilibrent entre le sang artériel et le sang de la veine jugulaire. Turner *et al* ³² a également proposé un modèle pharmacocinétique permettant de prédire la diffusion du sévoflurane au niveau cérébral.

1.8.3. Métabolisme du sévoflurane

Initialement décrit par Kharasch *et al* ^{33,34}, le métabolisme du sévoflurane contrairement aux autres gaz halogénés est faible (5% de la dose) et s'opère au niveau hépatique. La molécule est clivée par hydrolyse enzymatique de la fonction éther pour donner naissance à son métabolite principal, l'hexafluoroisopropanol (HFIP) et des ions fluorures ³⁵. Comme le montre également Kharasch, cette transformation du sévoflurane est dépendante du cytochrome P450, et particulièrement de l'isoforme 2E1 ^{34,36}. Cet isoforme est pratiquement absent des cellules rénales, ce qui explique le métabolisme hépatique quasi exclusif. Le HFIP est rapidement conjugué à l'acide glucuronique pour être éliminé par les urines (**Figure 7**) ainsi que les fluorures générés. Au niveau plasmatique, le HFIP est retrouvé préférentiellement sous sa forme conjuguée (85% de la dose plasmatique totale ³⁶).

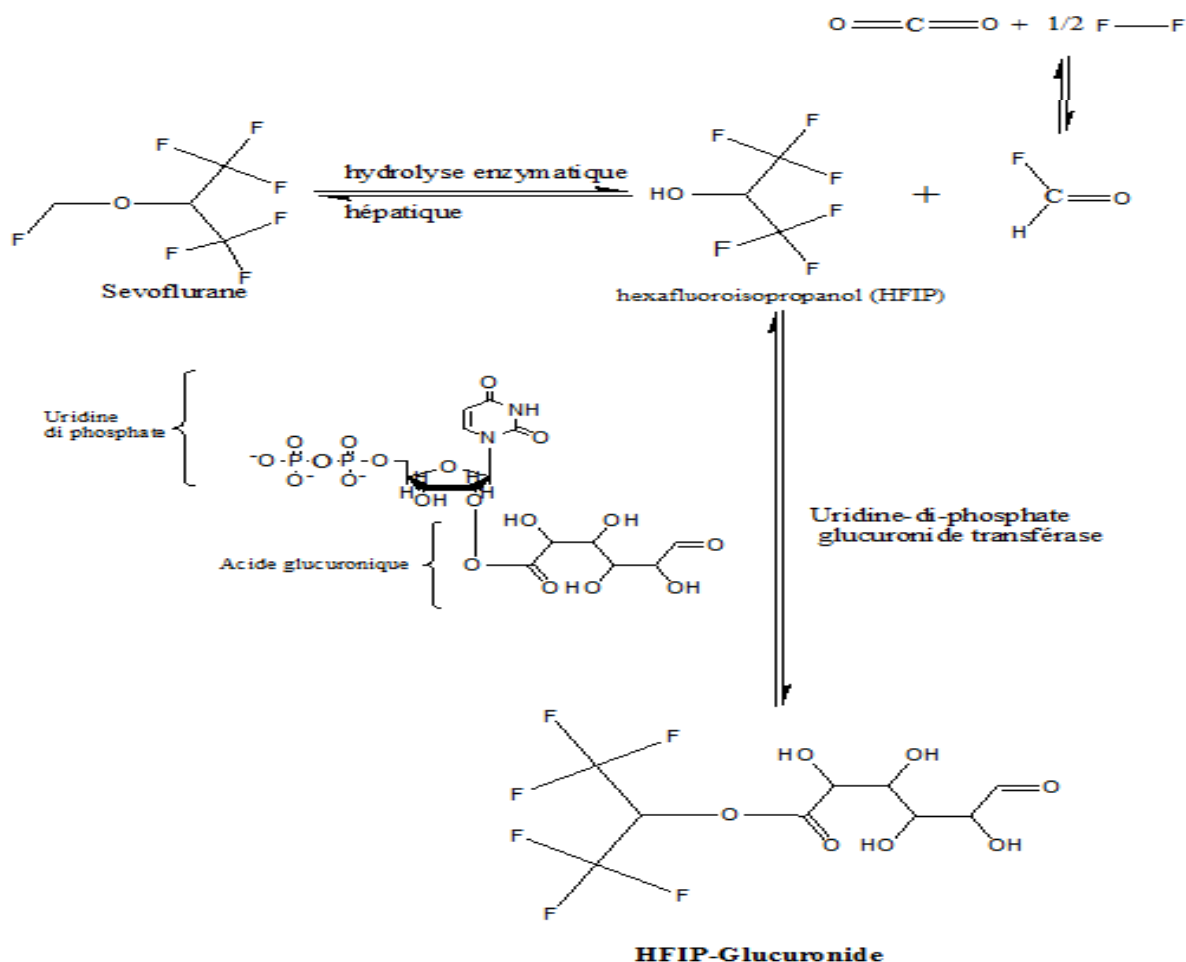


Figure 7 : schéma récapitulatif du métabolisme du sévoflurane

2. Toxicité du sévoflurane

2.1. Toxicité du principe actif

La toxicité du sévoflurane est surtout représentée par les effets indésirables plus ou moins graves cités en 1.5 qui peuvent en certain cas être très délétères (hyperthermie maligne par exemple). La toxicité directe du produit sur un organe donné n'a pas été démontrée dans les conditions d'utilisation décrites dans le Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP). Cependant, dans plusieurs études de cas ^{37,38} en médico-légal les auteurs ont tenté de corréler les concentrations en sévoflurane dans le sang et les organes de patients décédés lors d'administrations accidentelles de sévoflurane. Dans ces études, le décès semble résulter de l'hypoxie qui résulte de l'inhalation de ce médicament pur et non mélangé à de l'oxygène mais aussi d'une toxicité du gaz pur au niveau pulmonaire à type d'œdèmes dus à des doses très importantes. Les dosages plasmatiques par chromatographie en phase gazeuse ont montré des taux de sévoflurane faibles (15mg/l) bien inférieurs aux taux habituels retrouvés chez les patients anesthésiés et ce, sans toxicité démontrée. La toxicité du sévoflurane dans ces études médico-légales semble donc corrélée à de grandes quantités de gaz pur inhalées ou ingérées sous forme liquide, ce qui n'a rien à voir avec l'utilisation habituelle du produit.

2.2. Toxicité des métabolites et produits de dégradations

2.2.1. Le composé A

Lors de protocoles de sédation avec le sévoflurane via l'AnaConDa, il se forme 2 métabolites principaux : le HFIP et les ions fluorures comme décrit en **Figure 7**. Pour être exhaustif et au regard de la toxicité du sévoflurane, il faut également citer le composé A communément appelé « compound A » ou fluoromethyl 2,2-difluoro-1-(trifluoromethyl)vinyl ether (**Figure 8**). Ce composé, potentiellement toxique n'est généré qu'au contact de la chaux servant à absorber le CO₂ dans un système d'anesthésie en circuit fermé ^{39,40} et, à ce titre, est un produit de dégradation du sévoflurane. Il correspond à la perte d'un atome de fluor et à la création d'une double liaison supplémentaire sur la molécule.

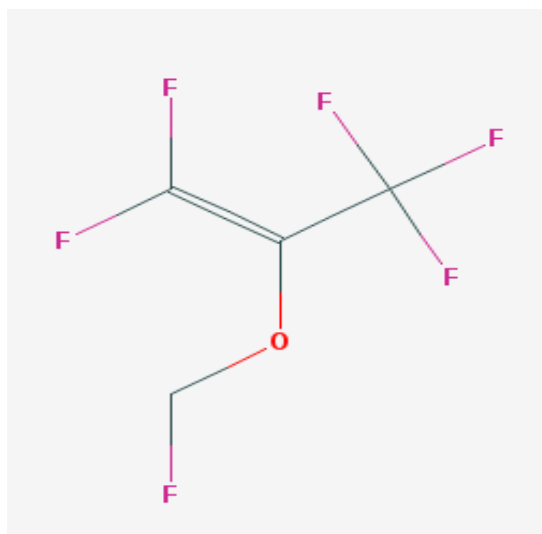


Figure 8 : fluoromethyl 2,2-difluoro-1-(trifluoromethyl)vinyl ether ou compound A

La formation du composé A a toujours fait partie des facteurs limitant l'utilisation de cet halogéné en circuit fermé de par sa toxicité rénale : sa formation est conditionnée par divers paramètres tels que la concentration en sévoflurane, le débit de gaz frais, le type d'absorbant utilisé et le degré d'hydratation de celui-ci par exemple. Chez le rat, il a été montré que le compound A, après conjugaison au glutathion et métabolisation par une β lyase générait des radicaux libres hautement réactifs responsables de lésions tubulaires proximales ⁴¹.

Avec l'AnaConDa, il n'y a pas nécessité d'avoir d'absorbant de CO_2 . Cette dégradation n'a donc pas lieu, ce qui est un argument en faveur de l'utilisation du sévoflurane avec ce dispositif plutôt qu'en circuit fermé.

2.2.2.2. L'hexafluoroisopropanol

Comme vu précédemment le HFIP est rapidement produit par métabolisme hépatique puis rapidement éliminé après glucuroconjugaison dans les urines. De ce fait, les taux de HFIP pouvant être retrouvés dans le sang des patients sont la plupart du temps très faibles ($<5\mu\text{mol/l}$) et aucune toxicité ³⁶ due à ce métabolite n'a été démontrée pour des protocoles de sédation de quelques heures.

Lors de protocoles de sédation longue, il est important de vérifier que cela soit toujours le cas : l'étude des concentrations en HFIP libre, forme active de la molécule, nous permet de déterminer si d'une part la glucuroconjugaison est efficace dans la durée et de l'autre si l'élimination rénale n'est pas saturée.

2.2.3. Toxicité rénale des ions fluorures

Ces anions monovalents sont reconnus comme toxiques au niveau rénal. Les travaux de Mazze *et al* sur la toxicité du fluor générée par la métabolisation du méthoxyfurane^{42,43,44} ont abouti à la détermination d'une concentration plasmatique de 50µmol/l comme seuil toxique et à une concentration de 90µmol/l comme responsable d'insuffisance rénale sévère. Or, de tous les halogénés, le sévoflurane est celui libérant le plus d'ions fluorures lors de son utilisation^{45,46} et l'on retrouve souvent des taux de fluorures supérieurs à 50µmol/l lors d'anesthésies au sévoflurane. Par ailleurs, d'autres auteurs ont comparé la fonction rénale et les taux plasmatiques en fluorures de patients insuffisants rénaux (n=14) anesthésiés par isoflurane et sévoflurane⁴⁷. Ils ont montré d'une part des taux supérieurs à 50 µmol/l pour le bras sévoflurane versus des valeurs inférieures à 10 µmol/l pour le bras isoflurane et d'autre part une fonction rénale identique, sans signe de toxicité rénale dans les 2 groupes.

Cette absence de toxicité rénale pour le sévoflurane alors que les taux plasmatiques de fluorures peuvent atteindre des valeurs bien supérieures à 50 µmol/l s'explique par la localisation de la métabolisation de l'halogéné. Pour le méthoxyflurane, la métabolisation se situe au niveau rénal ce qui sous-entend que la valeur locale de la concentration en fluorures est supérieure au 50µmol/l mesurés au niveau périphérique lors de l'apparition de la toxicité. Le sévoflurane, lui, est métabolisé par le cytochrome P450 2E1. La concentration de l'isoforme P450 2E1 est beaucoup plus importante au niveau de l'hépatocyte que dans la cellule tubulaire rénale. La production de fluorures au niveau rénal est donc minime pour le sévoflurane. Il a été démontré *in vitro*, que la vitesse de production rénale des fluorures est de 0,05 nmol/mg/h contre 4 nmol/mg/h pour l'hépatocyte lors d'administration de sévoflurane^{34,48}.

2.3. Toxicité potentielle lors d'une sédation de longue durée

Il est important de vérifier les taux de sévoflurane d'HFIP et de fluorures lors de protocoles de longues durées : en effet, si ces 3 composés sont peu toxiques à faible dose, ils peuvent le devenir chez des patients dont les fonctions rénale et/ou hépatique sont diminuées *a fortiori* pendant de longues périodes d'administration. Il est nécessaire de vérifier si les processus de détoxification du HFIP ne sont pas dépassés et si la production de fluor ne finit pas par atteindre des taux toxiques.

3. Anesthetic Conserving Device (ou ACD ou AnaConDa)

3.1. Description technique

3.1.1. Présentation du dispositif

Le système AnaConDa (Sedana Medical AB, Sundbyberg, Suède) est un matériel peu volumineux, inséré entre le patient et le respirateur, à la place du filtre échangeur de chaleur et d'humidité dont il joue le rôle (**Figure 9**). Il permet l'administration et le recyclage du gaz anesthésique, et minimise au maximum la pollution par le gaz de la chambre du patient. La complexité des appareillages nécessaires et les problèmes de pollution de l'environnement imposaient l'utilisation des halogénés au bloc opératoire. Du fait de sa simplicité d'utilisation et de l'absence de rejet de gaz hors du circuit, l'AnaConDa a permis l'utilisation de ces médicaments en unité de soins intensifs. C'est un dispositif médical présentant le marquage CE.

Il est constitué de deux filtres à travers lesquels le patient respire comme présenté **Figure 9**.

- Un filtre antibactérien et antiviral : il permet de retenir les germes qui pourraient se disséminer dans le circuit.
- Un filtre charbon actif : c'est grâce à lui que le sévoflurane expiré par le patient est recyclé. En effet, ce filtre capte 90% du sévoflurane expiré⁸ ce qui réduit d'autant la pollution de l'environnement. De plus, le sévoflurane stoppé par le charbon actif est ré-inhalé par le patient lors de l'inspiration suivante. Ceci a pour avantage une réduction importante de la consommation en gaz et donc du coût de traitement.

Par ailleurs, le dispositif comporte plusieurs connections :

- Un connecteur avec le respirateur
- Un connecteur avec l'arrivée de l'agent anesthésique sous forme liquide
- Un micro-évaporateur au niveau duquel le gaz passe de l'état liquide à l'état gazeux avant d'être inhalé par le patient
- Un connecteur avec le patient
- Un connecteur avec l'analyseur en continue de la fraction expirée en anesthésique



Figure 9 : Système AnaConDa

3.1.2. Positionnement du système dans le circuit de ventilation

L'AnaConDa se dispose en lieu et place de l'échangeur de chaleur et d'humidité. Il est relié à plusieurs dispositifs comme le montre la **Figure 10**.

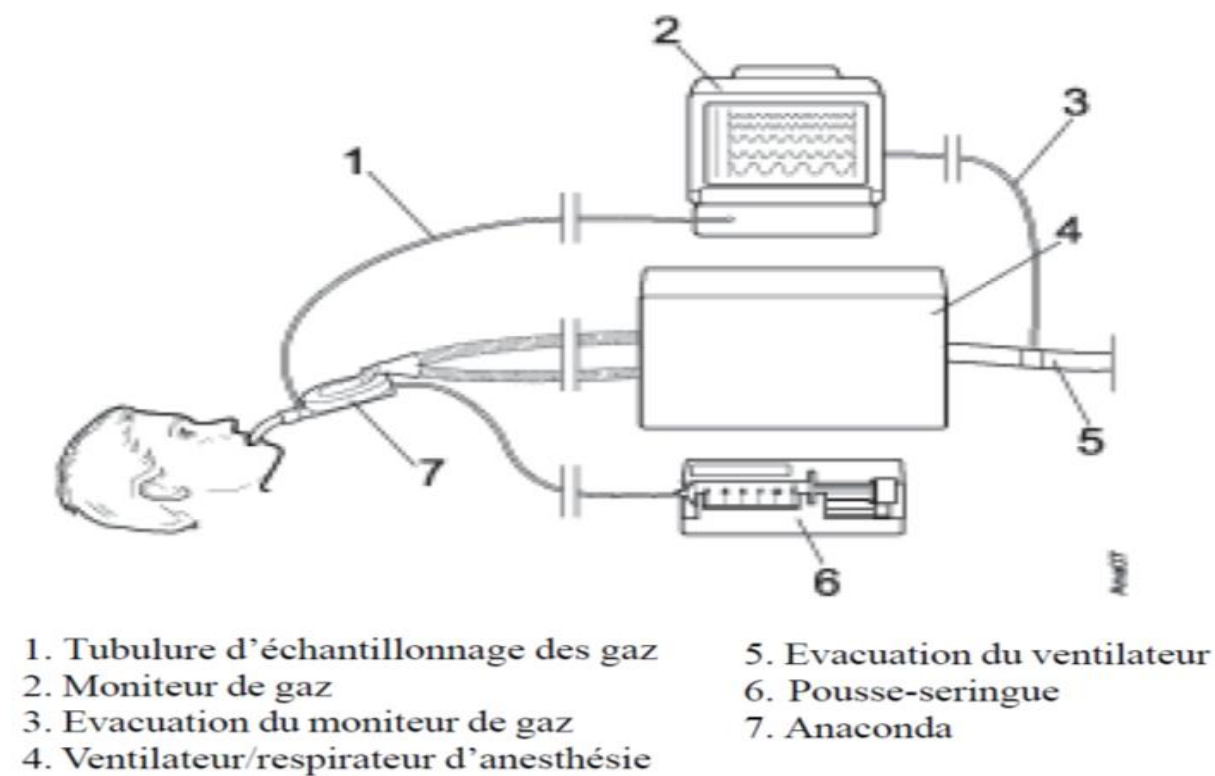


Figure 10 : Positionnement de l'AnaConDa dans le circuit de ventilation

Sont connectés sur l'AnaConDa (7):

- Le respirateur (4)
- L'analyseur en continu de la fraction expirée en gaz d'anesthésie (2): le taux exprimé en pourcentage de gaz dans l'air expiré et inspiré est déterminé par une méthode de spectroscopie infrarouge
- La seringue AnaConDa sur un pousse seringue (6): les matériaux constitutifs de la seringue sont insolubles dans le sévoflurane liquide (polypropylène et caoutchouc pour le joint de piston). Elle est comprise dans le kit du système.

3.1.3. Fonctionnement du dispositif

3.1.3.1. Autour du filtre AnaConDa

Le patient intubé est donc relié au respirateur d'anesthésie (4 sur la **Figure 10**) avec comme interface l'AnaConDa. Cet appareil permet la ventilation contrôlée des patients. Comme dans un circuit d'anesthésie classique les paramètres tels que le volume courant, la fréquence de ventilation et la concentration en oxygène de l'air inspiré peuvent être ajustés.

3.1.3.2. Au niveau du filtre AnaConDa:

Le patient respire donc à travers ce filtre (7 sur la **Figure 10**) l'air généré au moyen du respirateur. C'est à ce niveau, que l'air se charge du gaz d'anesthésie. Celui-ci est injecté sous forme liquide par le pousse-seringue (6 sur la **Figure 10**) dans le microévaporateur (5 sur la **Figure 9**). A ce niveau, le gaz liquide est en contact avec le flux respiratoire dans lequel il se vaporise. Le patient inhale donc un mélange air-sévoflurane. Le pourcentage volumique de gaz halogéné inhalé est proportionnel au débit du pousse-seringue. Le praticien peut ajuster ce débit afin d'obtenir la concentration en fonction de la CAM désirée. Celle-ci peut être contrôlée par le moniteur de gaz qui est branché sur le filtre côté patient (voir paragraphe 3.1.4).

Au niveau de ce filtre, le charbon actif (3 sur la **Figure 9**) retient le gaz non absorbé par le patient ainsi que celui qui est éliminé par voie pulmonaire lors de l'expiration. Après une phase de saturation de ce filtre, le sévoflurane est re-inhalé lors de l'inspiration suivante. Comme vu dans le paragraphe 1.2.2.1, la forte volatilité du desflurane fait que celui-ci n'est pas retenu sur le charbon actif. L'isoflurane et le sévoflurane sont donc les seuls gaz halogénés utilisables avec ce dispositif.

3.1.4. Analyse de la teneur en gaz de l'air inspiré et expiré

Sur le graphique exposant la teneur en gaz en fonction du temps (**Figure 11**) il existe plusieurs phases: la fraction expirée est mesurée juste avant le début de l'inspiration et correspond à la concentration alvéolaire du patient. Ce paramètre correspond à la quantité de gaz à la quelle est exposé le patient et est donc corrélé avec la profondeur d'anesthésie.

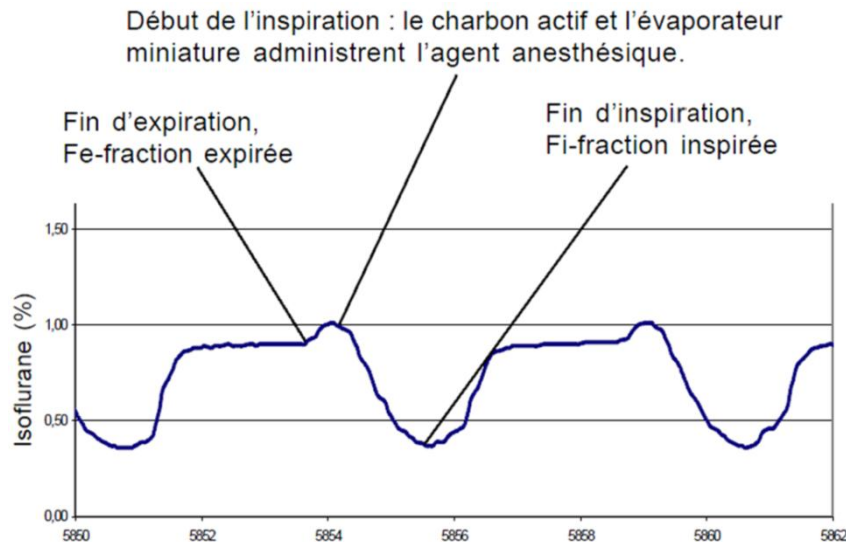


Figure 11 : Evaluation de la teneur en gaz (%) en fonction du temps (secondes) pour l'isoflurane administré par AnaConDa

3.1.5. Réglage du dispositif

Le principal réglage correspond au débit du pousse seringue qui apporte le sévoflurane dans le microévaporateur de l'AnaConDa : en effet le manipulateur règle le pousse seringue selon un abaque, établi à partir des travaux de Belda *et al*⁴⁹, dont il dispose dans la notice du dispositif afin d'obtenir la fraction expirée désirée. Celui-ci (**Figure 12**) est donné pour une fraction expirée à 0.5%. Pour une fraction supérieure, il faut multiplier le débit en proportion (fois 2 pour 1% par exemple).

Exemple : Débit du pousse-seringue nécessaire pour atteindre une concentration de gaz 0,5 %.

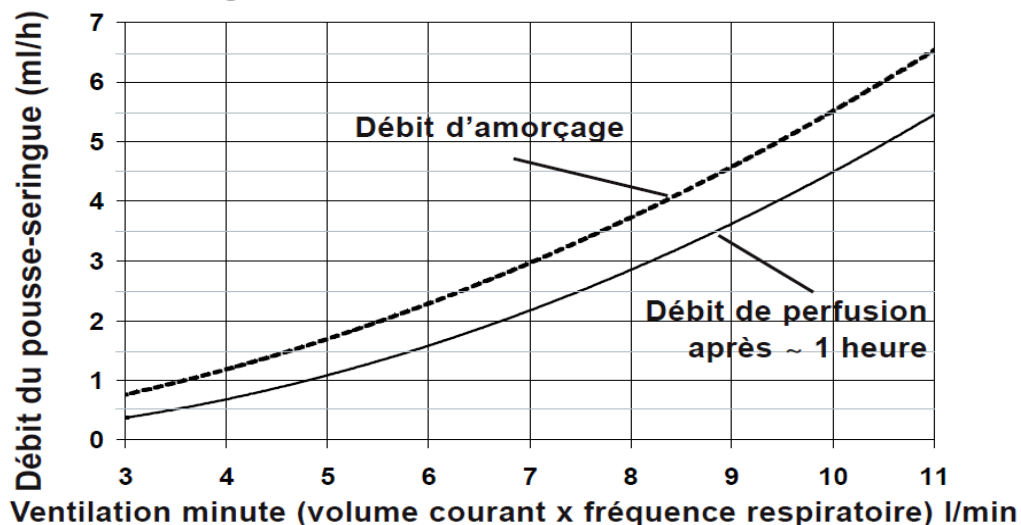


Figure 12 : abaque débit du pousse seringue en fonction de la ventilation minute (selon Belda *et al* ⁴⁹)

En pratique, le manipulateur règle le débit préconisé par l'abaque et l'ajuste ensuite en fonction des valeurs de la fraction expirée données par l'analyseur en continu afin de rester le plus proche possible de la valeur cible.

4. La sédation de longue durée en réanimation par inhalation grâce à l'AnaConDa

4.1. Objectifs de la sédation en réanimation

Les patients de réanimation sont des patients souvent polytraumatisés qui nécessitent des soins importants souvent douloureux et traumatisants. Dans ce contexte, la sédation des patients s'impose : elle agira préférentiellement sur trois axes principaux :

4.1.1. Lutte contre la douleur

En effet, les fractures, brûlures, œdème, chirurgie génèrent des douleurs importantes. De même la réalisation de certains gestes est décrite comme très douloureuses par les patients. Ainsi, Stanik-Hutt *et al* ⁵⁰ a montré que des gestes tels que l'aspiration trachéale, l'ablation des drains thoraciques et la mobilisation des patients lors des pansements entraînaient des évaluations mesurées par l'échelle visuelle analogue entre 30 et 100 mm ce qui correspond à

des douleurs d'intensité variable mais pouvant être sévères. Une sédation bien conduite a pour ambition d'abolir au maximum la nociception des patients.

4.1.2. Prévention des troubles neuropsychiques

Les patients de réanimation sont souvent dans l'incapacité de communiquer du fait de la ventilation mécanique ou en raison de la douleur par exemple et peuvent ressentir un fort sentiment d'abandon et une angoisse quasi permanente. La sédation permet donc de lutter contre l'apparition d'un syndrome de stress post traumatique.

4.1.3. Amélioration de l'oxygénation tissulaire

La sédation rend possible l'adaptation du patient à la ventilation mécanique, ce qui permet de gérer et d'optimiser l'apport en oxygène aux tissus et ainsi d'éviter les effets délétères d'une hypoxie tissulaire.

4.2. Pourquoi une sédation par inhalation plutôt que par voie intraveineuse ?

La sédation en réanimation associe 3 types de produits : un analgésique la plupart du temps morphinique pour le traitement de la douleur, un hypnotique par voie intraveineuse ou inhalée, et parfois un curare pour la myorelaxation.

Classiquement, la voie intraveineuse est la plus utilisée pour la réalisation de sédation en soins intensif : c'est le midazolam (benzodiazepine) ou le propofol (anesthésique phénolique) qui sont préférentiellement utilisés. Les raisons qui ont amené cette suprématie des médicaments intraveineux sont historiques et sous tendues par des contraintes techniques, de coût et d'exposition du personnel soignant. En effet les molécules injectables sont d'apparition bien antérieure aux halogénés modernes (sévoflurane et desflurane) à la pharmacocinétique intéressante. De plus, en tout cas pour le sévoflurane et l'isoflurane (pour le desflurane, l'utilisation de l'AnaConDa est impossible du fait de sa trop forte volatilité, voir chapitre 1.2.2.1), le filtre AnaConDa représente une évolution. Il permet :

- Un très faible rejet dans l'atmosphère grâce au recyclage de 90% de l'halogéné par le filtre ⁵¹. Ceci limite donc les effets indésirables génotoxiques que pourraient subir les praticiens ^{23,24} et les contraintes drastiques de renouvellement d'air habituellement nécessaires lors d'utilisation d'halogénés.
- Une diminution de la consommation et du coût en gaz due au recyclage.

- L'absence de formation du composé A toxique rénal se formant dans les absorbants à la chaux dans les circuits fermés ³⁹(paragraphe 2.2.1).

Par ailleurs, des travaux ont montré les avantages intrinsèques des halogénés sur les produits injectables. Nous pouvons citer par exemple Meiser *et al* ⁵² qui a étudié chez 60 patients la sédation par propofol comparé au desflurane (sans l'AnaConDa) et a montré un réveil plus rapide et prédictif pour le desflurane que pour le propofol après des durées de sédation de 10.6 heures en moyenne.

La concordance des propriétés pharmacocinétiques intéressantes des halogénés avec l'apparition du filtre AnaConDa a donc stimulé la réalisation d'études sur l'utilisation de ces gaz avec ce filtre. La plupart de ces études ont été réalisées avec l'isoflurane : des articles de revue concluent également à la sûreté et l'efficacité de l'AnaConDa comme le travail de Meiser *et al* ⁵³ et les travaux de Sackey *et al* ^{54,55} démontrent les bonnes performances cliniques du dispositif médical avec l'isoflurane.

L'utilisation conjointe des halogénés avec l'AnaConDa constitue donc une association performante pouvant apporter aux praticiens et aux patients un confort et une sécurité supplémentaires.

Travail expérimental

1. Déroulement de l'étude

Nous pouvons distinguer 2 grandes étapes dans la réalisation de cette étude qui chacune a fait l'objet d'une publication internationale : une phase de mise au point et d'optimisation des techniques de dosages utilisées (**Publication internationale 1**), et une phase correspondante à l'exploitation des données issues de l'étude clinique mise en place (**publication internationale 2**).

1.1. Rationnel de ce travail

La mise sur le marché de l'AnaConDa a été précédée d'études réalisées sur l'isoflurane administré pendant de courtes durées ^{53,54,55}. Par contre, peu d'études existent avec le sévoflurane. Quelques travaux ont néanmoins été publiés durant la réalisation de ce travail de thèse et tous mettent en évidence les bonnes performances cliniques de l'association sévoflurane/AnaConDa. Nous pouvons citer :

- Tempia *et al* ⁵¹ qui comparent l'administration du sévoflurane par le biais d'un système fermé avec l'administration par l'AnaConDa : il conclut à l'équivalence des consommations en halogénés dans les 2 systèmes lorsque l'on utilise un débit de gaz frais de 1.5 l/min.
- Stureson *et al* ²⁹ qui étudient la cinétique plasmatique du gaz sur 30 minutes lors d'induction pour chirurgie cardiaque et qui montre un comportement comparable à une induction réalisée grâce à un circuit ouvert.
- Enlund *et al* ⁵⁶ qui déterminent un modèle pharmacocinétique de l'administration de sévoflurane avec l'AnaConDa en se basant sur les fractions expirées en gaz.
- Belda *et al* ⁴⁹ qui ont modélisé avec précision l'évolution des fractions expirées en sévoflurane en fonction de la vitesse du pousse seringue, ce qui a permis l'établissement du nomogramme utilisé pour le réglage de ce dispositif lors de la mise en place d'une sédation avec l'AnaConDa et le sévoflurane (Voir **Figure 12**).

Très récemment, Mesnil *et al* ⁵⁷ ont réalisé une comparaison clinique du sévoflurane par AnaConDa avec une sédation réalisée grâce au propofol sur des durées allant de 24 à 96 heures et concluent encore une fois à l'avantage clinique du sévoflurane sur le propofol en terme de rapidité de réveil et de sécurité d'emploi sans pour autant déterminer la concentration plasmatique en sévoflurane et ses métabolites.

Par tous ces travaux nous voyons bien l'engouement que suscite l'utilisation du sévoflurane avec l'AnaConDa et tout semble désigner cette association comme une technique de choix en

sédation. Cependant, la pharmacocinétique du produit administré au moyen de l'AnaConDa, *a fortiori* lors de longues périodes de sédation est méconnue et il nous a semblé nécessaire de déterminer ces paramètres au moyen d'une étude pharmacocinétique basée sur les concentrations plasmatiques réelles en sévoflurane et ses métabolites.

La meilleure connaissance de ce type de protocole de sédation a donc motivé notre démarche. Ainsi, si toutes les conditions sont vérifiées, il pourra être plus largement utilisé.

1.2. Les outils utilisés

Ce travail a nécessité d'une part le développement et la validation de méthodes de dosage afin de quantifier le sévoflurane, le HFIP ainsi que les fluorures et d'autre part, l'utilisation d'un logiciel de pharmacocinétique afin de définir le modèle correspondant à cette administration du sévoflurane.

1.2.1. Quantification du sévoflurane et du HFIP

1.2.1.1. Objectifs

Le développement d'une méthode de dosage plasmatique est la condition préalable à la réalisation de toute étude pharmacocinétique. Dans le cadre de notre travail, il nous a fallu développer une technique de dosage remplissant plusieurs critères :

- Les composés dosés (sévoflurane et HFIP) sont tous les deux des produits volatils. Il convient donc de définir une technique de prélèvement prévenant au maximum l'évaporation des molécules avant dosage.
- Rapidité d'analyse : la réalisation d'une cinétique plasmatique rigoureuse nécessite de nombreux dosages. La rapidité des dosages rend donc possible la quantification de la totalité des prélèvements sur une seule session de dosage limitant ainsi les consommables et le coût de l'analyse.
- Linéarité sensibilité et exactitude sur une large gamme de concentrations (faible limite de quantification) : il faut en effet pouvoir déterminer les faibles taux plasmatiques pendant les phases de croissance et décroissance mais aussi les taux importants durant le plateau de concentration plasmatique.
- Spécificité importante : la matrice plasmatique étant complexe, il faut s'assurer de la spécificité de la technique.

- Dosage plasmatique simultané du sévoflurane et du HFIP : afin de simplifier la méthode, et de limiter le nombre et les manipulations d'échantillon et donc le coût des analyses.

1.2.1.2. Revue de la littérature

En premier lieu et au regard du matériel dont nous disposions dans le laboratoire, il nous a paru évident de centrer nos recherches sur une technique utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à une injection headspace (HS/GC : voir paragraphe 1.2.1.3 pour les détails de l'appareil) pour quantifier nos échantillons. En effet, comme nous l'avons vu au paragraphe 1.2.2.2, le sévoflurane et le HFIP sont 2 molécules organiques volatiles en solution dans le plasma, ce qui est le domaine d'application de cette technique⁵⁸.

Une revue de la littérature a été réalisée afin de déterminer si nous pouvions appliquer une méthode déjà publiée. Le **Tableau 7** montre une présélection de travaux utilisant des techniques qui pourraient convenir.

	quantification du sévoflurane	quantification du HFIP	détecteur
Burrows <i>et al.</i> ³⁷	oui	non	FID
Rosales <i>et al.</i> ³⁸	oui	non	FID
Nakamura <i>et al.</i> ³⁰	oui	non	MS
bergamo <i>et al.</i> ⁶⁰	oui	non	FID
Yang <i>et al.</i> ⁶²	oui	non	FID
Morgan <i>et al.</i> ⁶¹	non	oui	FID
Accorsi <i>et al.</i> ^{63,64}	oui	oui	MS

Tableau 7 : exemples de travaux utilisant la chromatographie phase gazeuse pour quantifier le sévoflurane ou le HFIP (FID : Flame Ionization Detector ; MS : Mass spectrometry)

Cette revue bibliographique ne nous a permis de déterminer qu'un seul auteur ayant développé le dosage simultané du sévoflurane et du HFIP (Accorsi *et al.*⁶⁴). Sa technique utilise de plus la spectrométrie de masse comme détecteur, ce qui présente plusieurs avantages par rapport au FID :

- Une sensibilité supérieure, en particulier en mode SIM (Single Ion Monitoring : voir paragraphe 1.2.1.3)

- Une spécificité bien supérieure : en effet, un spectre de masse est spécifique d'une molécule, ce qui permet de la détecter et de la quantifier de façon univoque sur le chromatogramme.

Nous avons donc décidé d'utiliser la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse avec injection headspace (voir paragraphe 1.2.1.3).

La technique par Accorsi *et al* ne nous a pas paru complètement adaptée à notre application et ce pour plusieurs raisons :

- Elle utilise comme étalon interne l'enflurane qui n'est pas disponible car il n'est plus commercialisé.

- Pour la dilution des solutions mères des étalons, il utilise le sulfure de carbone qui est une substance hautement toxique ^{65,66,67,68,69}. Nous avons décidé de ne pas l'utiliser pour des raisons de sécurité.

- Le temps d'analyse avec cette technique est de 18 minutes ce qui nous a paru trop long.

C'est pourquoi nous avons décidé de développer une méthode HS/GC/MS plus adaptée à notre application.

1.2.1.3. Spectrométrie de masse couplé à la chromatographie phase gazeuse avec injection headspace (HS/GC/MS) : description

Le système HS/GC/MS commercialisé par Perkin Elmer que nous avons utilisé est composé de trois modules (**Figure 13**):

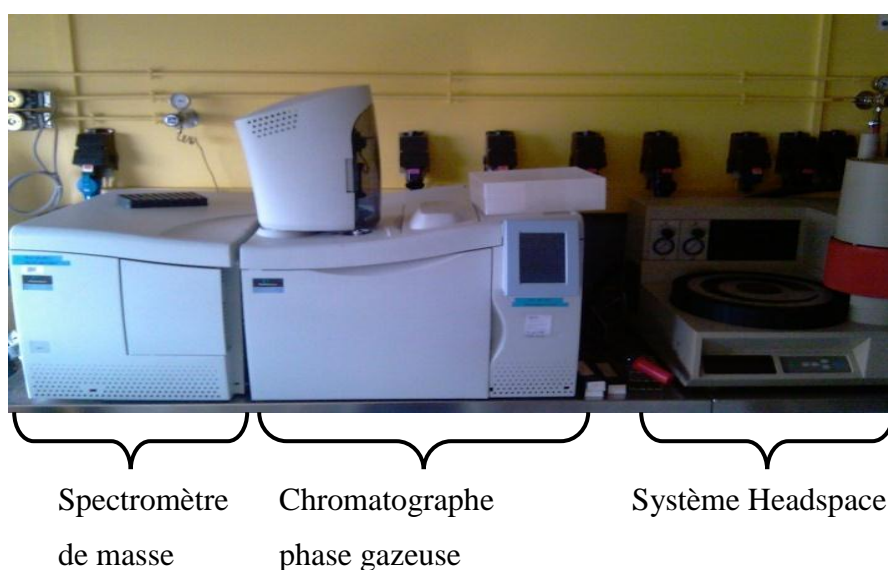


Figure 13 : Aperçu global du système HS/GC/MS

- Un système headspace ou espace de tête HS40 :

Ce dispositif permet, par le chauffage et la mise sous pression d'un échantillon contenu dans un flacon hermétiquement fermé, d'injecter dans le système chromatographique tout ou partie des produits volatils contenus dans une matrice (en fonction de la température de chauffage)

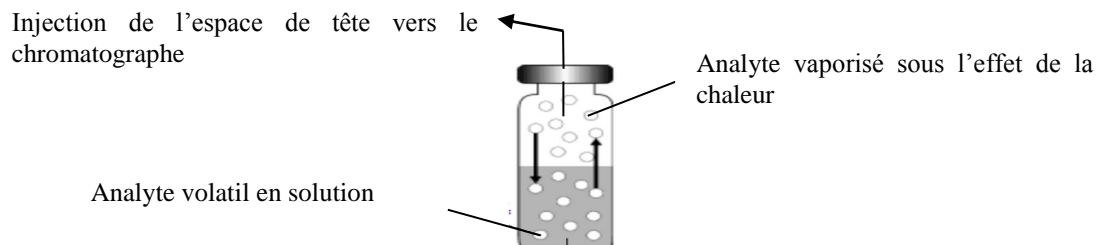


Figure 14 : principe de fonctionnement d'une injection headspace (espace de tête)

- Un chromatographe phase gazeuse Clarus 500 :

La chromatographie phase gazeuse est la technique d'excellence pour la séparation et le dosage de molécules organiques volatiles dans une matrice. La séparation est basée sur l'affinité relative des molécules vaporisées pour d'une part une phase stationnaire et de l'autre un gaz vecteur (dans ce travail c'est l'hélium qui a été utilisé). Les interactions des analytes avec la colonne sont basées sur des phénomènes de polarité et d'encombrement stérique.

La colonne est dite capillaire du fait de son très faible diamètre (0.25 mm de diamètre interne par exemple) et est recouverte intérieurement d'un film de polymère de polarité et d'épaisseur définies (1.4µm par exemple) qui constitue la phase stationnaire. L'hélium circule dans cette colonne qui est d'une longueur comprise entre 10 et 60 mètres et est enroulée sur un support (**Figure 15**). Les analytes s'échangent entre ce gaz et la phase stationnaire avant d'arriver au détecteur. Le temps qu'ils mettent est appelé temps de rétention et est spécifique de la molécule éluée. La colonne se situe dans un four (dont la température peut varier entre la température ambiante et 400 degrés ce qui permet de modifier la vitesse d'élution des molécules (une augmentation de température diminue le temps de rétention).

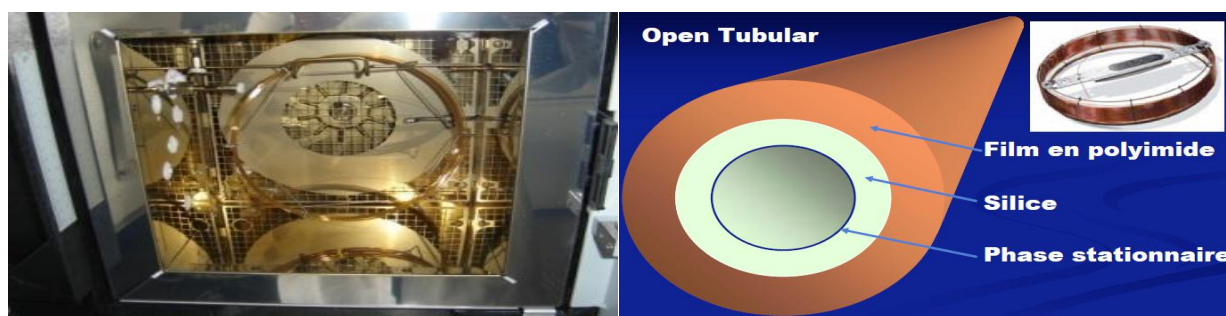


Figure 15 : Colonne capillaire installée dans un four et schémas descriptif d'une colonne

- Un spectromètre de masse

Il joue le rôle de détecteur. Il comprend, pour le matériel utilisé dans ce travail de thèse,

- une source à impact électronique (inner source sur **Figure 16**): Elle génère, par le chauffage d'un filament un flux électronique qui va entrer en contact avec les molécules qui arrivent du chromatographe. Celles-ci subissent donc une fragmentation spécifique de la molécule pour une énergie électronique donnée. A la sortie de la source, il y a donc des ions monochargés provenant de la fragmentation de la molécule mère. Les ions issus de la fragmentation sont spécifiques de la molécule qui est éluée.

- des lentilles d'accélération (lens 1 et 2 sur **Figure 16**) : soumises à une tension électrique, elles permettent d'accélérer et de focaliser les ions dans le quadripôle.

- un quadripôle (analytical quad sur **Figure 16**): c'est l'analyseur de masse à proprement parler. Il est constitué de 4 électrodes soumises à une tension sinusoïdale et une tension fixe. Les électrodes sont donc soumises à des potentiels électriques qui vont créer un champ électrique quadripolaire. Suivant le balayage de la tension sinusoïdale, ce champ électrique va varier de telle sorte qu'à un instant donné, seul un ion d'une masse donnée va pouvoir traverser le quadripôle et arriver au photomultiplicateur pour pouvoir être détecté. L'analyseur sépare les ions en fonction de leur rapport m/z c'est-à-dire masse divisé par charge de l'ion. En ionisation par impact électronique, des ions monochargés sont générés, ce qui fait que $z=1$ et $m/z=m$. En balayant toute la plage des masses, nous obtenons donc la répartition en masse des ions provenant de la fragmentation des molécules dans la source à impact électronique.

- un photomultiplicateur (photomultiplier sur **Figure 16**) : situé en sortie du quadripôle, il convertit lorsqu'un ion l'atteint, l'énergie de l'impact en énergie électrique interprétable par le système informatique de traitement des données.

Sur le spectromètre de masse, il est possible de travailler selon 2 modes :

- mode Full scan : le spectromètre balaye toute la gamme de masse enregistrable (classiquement de 40 à 400 g/mol). C'est le mode qui permet de caractériser de manière univoque la molécule qui arrive au détecteur en réalisant la répartition des ions en fonction des masses et leur abondance pour chaque masse après fragmentation dans la source à impact électronique. C'est une carte d'identité de la molécule. Mais la sensibilité n'est pas maximale (environ 0.5 ppm)

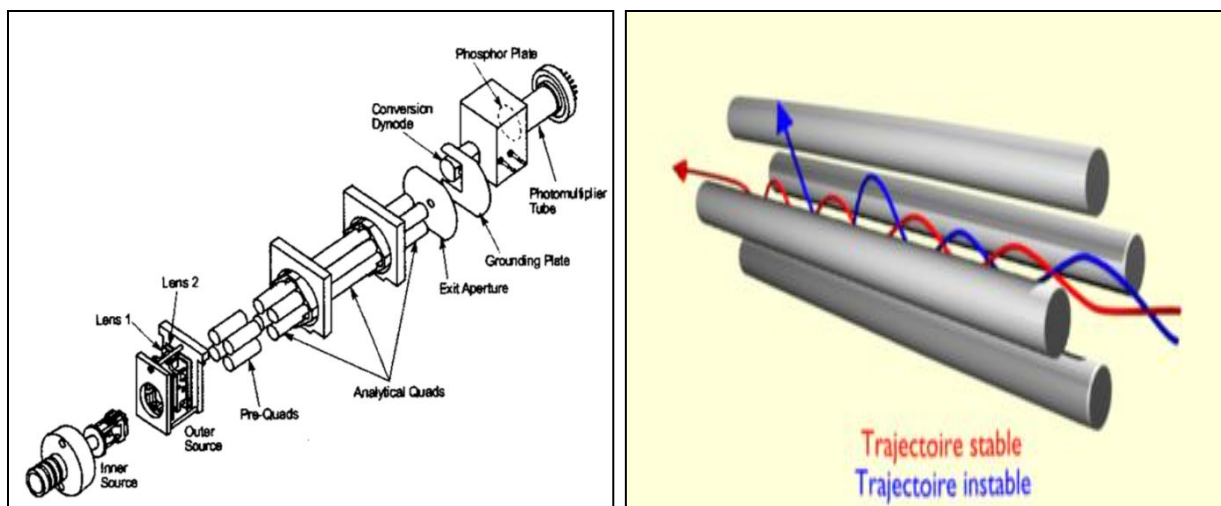


Figure 16 : schémas éclatés des composants du spectromètre de masse et trajectoire des ions

- Mode SIM : Single Ion Monitoring : le spectromètre est focalisé sur 1 ou quelques ions caractéristiques de la molécule à doser ce qui permet d'accroître grandement la sensibilité (de l'ordre de quelques dizaines de ppb). La spécificité est également assurée par la vérification du rapport d'abondance entre les différents ions par rapport à l'étalon (**Figure17**).

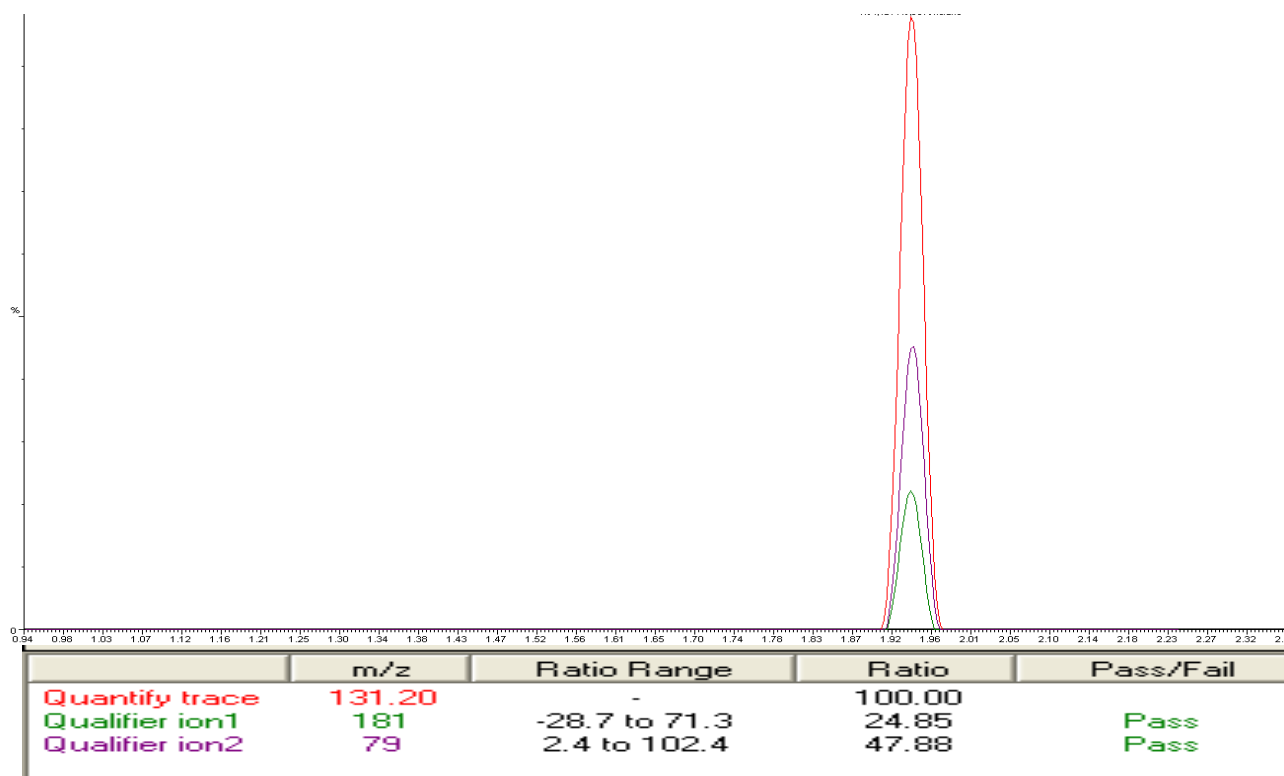


Figure17 : décomposition du pic chromatographique en les différents ions qui le composent et comparaison de leurs abondances relatives avec les valeurs théoriques

1.2.2. Dosage des fluorures par potentiométrie

Pour la quantification des fluorures plasmatiques libérés par le métabolisme du sévoflurane, nous avons utilisé une technique de potentiométrie grâce à une électrode spécifique aux fluorures.

Cette technique est basée sur la mesure de la différence de potentiel créée entre une électrode spécifique aux fluorures et les ions fluorures présents dans la solution. En établissant une courbe d'étalonnage grâce à des solutions étalons, la concentration de l'échantillon étant déterminée par comparaison des valeurs mesurées sur l'échantillon plasmatique inconnu.

1.2.3. Validation des méthodes de dosage

Toutes les méthodes utilisées dans cette étude ont fait l'objet d'une validation analytique en se basant sur le guide ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) Q2(R1) "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology". Ce guide détermine les différents items à déterminer lors de la validation d'une méthode de dosage. Ils sont :

- La spécificité : la méthode permet la quantification d'un élément spécifiquement, c'est-à-dire qu'elle ne subit pas d'interférence provenant d'autres constituants de la matrice dosée
- La précision: elle représente la capacité de la technique à donner le même résultat lors de la répétition des analyses. Elle est évaluée par la répétabilité et la fidélité intermédiaire. Une valeur de coefficient de variation de 10 % a été choisie comme maximum pour la validation de ces items.
- L'exactitude: elle représente l'écart par rapport à la valeur théorique du dosage. Une valeur de coefficient de variation de 10 % a été choisie comme maximum pour la validation de cet item.
- La linéarité : c'est la capacité de la méthode à donner des résultats directement proportionnels à la concentration des substances à doser. Elle est estimée par la valeur du coefficient de détermination r^2 calculé sur la courbe d'étalonnage. Un r^2 supérieur à 0.999 constitue le critère de validation de cet item.
- La limite de quantification : c'est la plus petite quantité quantifiable avec une précision et une exactitude inférieure à 15%.
- La limite de détection : c'est la plus petite concentration pour laquelle le signal chromatographique est égal à plus de trois fois l'amplitude du bruit de fond.

1.2.4. La modélisation pharmacocinétique

La modélisation pharmacocinétique permet, grâce à l'utilisation d'un logiciel, de déterminer les paramètres pharmacocinétiques propres à un produit dans une utilisation et une voie d'administration donnée. Nous avons utilisé Kinetic Pro (Wgroupe, France) pour modéliser la pharmacocinétique du sévoflurane dans son administration grâce au système AnaConDa. Le mode de calcul de ce logiciel est basé sur les modèles compartimentaux linéaires mamillaires^{70,71}. La théorie des compartiments mamillaires définit l'existence d'un volume central et de un ou plusieurs compartiments périphériques pouvant être indépendants entre eux dans lesquels la molécule étudiée diffuse en fonction de paramètres pharmacocinétiques que le logiciel détermine. Ces compartiments ne correspondent pas à des organes en particulier mais doivent être considérés comme des réservoirs pharmacocinétiques virtuels de la molécule étudiée. Par contre le compartiment central correspond à la circulation sanguine. Kinetic pro permet le calcul de deux types de constantes afin de décrire le modèle pharmacocinétique :

- Les macroconstantes : ce sont les coefficients et exposants de l'équation de la courbe qui décrit les concentrations plasmatiques en fonction du temps ($C(t)$). Cette équation est souvent la somme de plusieurs exponentielles (en fonction du nombre de compartiments). Dans l'**Équation 2**, A_1 , A_2 , a_1 et a_2 sont les macroconstantes d'un modèle à 2 compartiments estimées par Kinetic Pro.

$$C(t) = A_1e^{-a_1t} + A_2e^{-a_2t}$$

Équation 2 : exemple de l'équation de la courbe concentration/temps estimée par Kinetic pro pour un modèle à 2 compartiments

- Les microconstantes : plus parlantes d'un point de vue clinique et pharmacocinétique, elles représentent les paramètres pharmacocinétiques habituellement décrits pour le comportement pharmacocinétique d'une molécule. Les paramètres calculés par Kinetic Pro sont (**Figure 18**):

- Le volume de distribution (VDis)
- Les constantes de transfert entre les différents compartiments ($K_{1,2}$ et $K_{2,1}$)
- La constante d'absorption
- La clairance
- La constante d'élimination (K_{el})
- La demi-vie d'élimination

Kinetic Pro travaille en recherchant de façon itérative les macroconstantes qui minimisent au maximum un critère d'optimisation comme le critère de maximum de vraisemblance ou des moindres carrés par rapport à un modèle mathématique correspondant au modèle pharmacocinétique testé. A la fin de son calcul, Kinétic pro donne une estimation de l'erreur résiduelle non expliquée par le modèle et un aperçu graphique de la cinétique calculé en parallèle des points expérimentaux comme le montre la **Figure 18**.

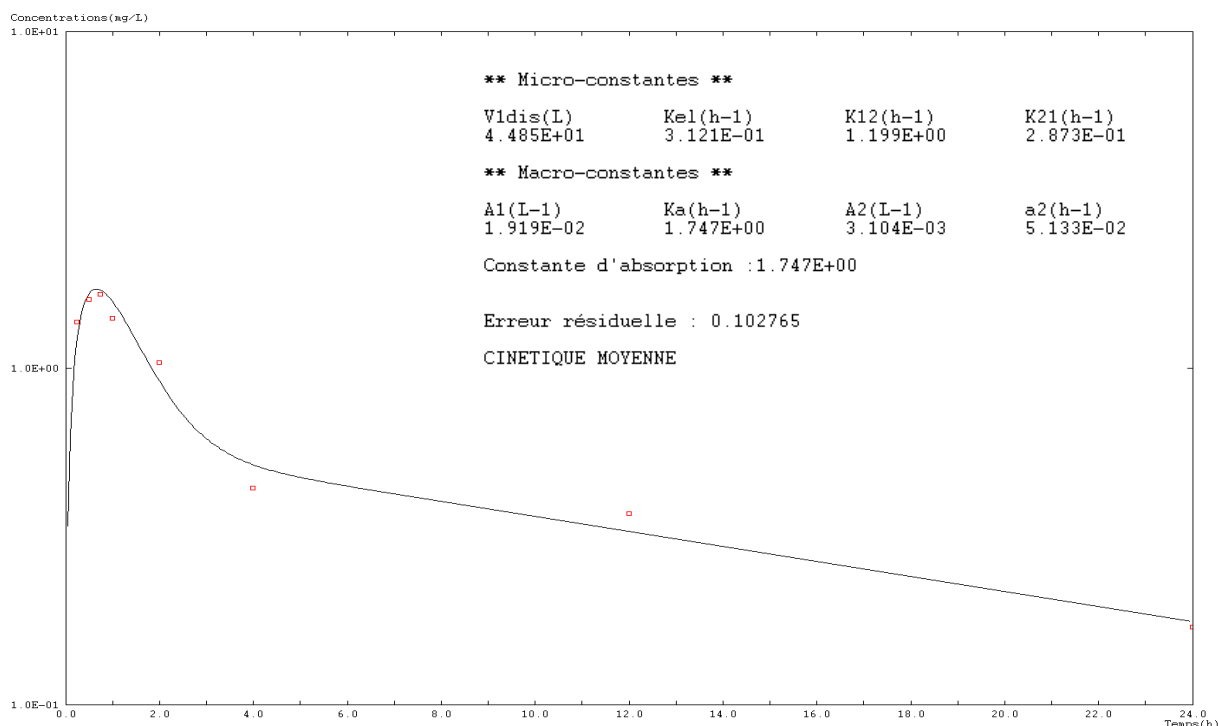


Figure 18 : exemple de cinétique calculée par Kinetic Pro (ligne noire) avec les points expérimentaux en rouge. Modèle à 2 compartiments, erreur résiduelle de 10%.

Ces paramètres calculés permettent de définir rigoureusement le comportement pharmacocinétique du sévoflurane en administration de longue durée grâce au filtre AnaConDa. De plus, par comparaison avec les valeurs retrouvées dans la bibliographie nous pouvons estimer les modifications pharmacocinétiques induites par ce protocole.

2. Mise au point et optimisation du dosage plasmatique du sévoflurane et du HFIP (Article 1)

2.1. Matériel et méthode

2.1.1. Synthèse des solutions étalons

L'étalonnage du système chromatographique ainsi que le processus de validation de la méthode analytique ont nécessité l'élaboration de solutions étalons dans le plasma afin de se rapprocher le plus possible des échantillons plasmatiques dosés chez les patients inclus dans l'essai clinique. Lors des premiers essais de fabrication de solutions mères, nous avons montré qu'il n'était pas possible de synthétiser de telles solutions dans l'eau de façon précise étant donné la faible solubilité aqueuse du sévoflurane.

Nous avons donc recherché un solvant lipophile pour fabriquer nos solutions mères qui permette de solubiliser le sévoflurane tout en possédant une température d'ébullition élevée pour ne pas se vaporiser en grande quantité lors du chauffage de l'échantillon dans le système headspace. Ainsi, nous avons pu fabriquer nos solutions étalons en rajoutant de faibles quantités de ces solutions mères dans une matrice plasmatique (Plasma Frais Congelé, EFS Clermont-Ferrand, France). Notre choix s'est porté sur l'undécane qui présentait ces caractéristiques et qui de plus ne présentait pas la toxicité du sulfure de carbone utilisé par Accorsi *et al*⁶⁴ (Tableau 8).

	Undécane	Sulfure de carbone
Point d'ébullition	196°C	46°C
Pression de vapeur (20°C)	<0.4 mm Hg	300 mm Hg
Phrases de risque	R36 R37 R38 (irritant)	R12 R23 R24 R25 (extrêmement inflammable, toxique)

Tableau 8 : Propriétés physiques des solvants de dilutions. R36 : irritant pour les yeux; R37 : irritant pour le système respiratoire; R38 : irritant pour la peau. R12 : extrêmement inflammable; R23 : toxique par inhalation; R24 : toxique par contact avec la peau; R25 Toxique si avalé.

Ces solutions étalons ont été synthétisées en ajoutant à 1ml de plasma frais congelé (EFS Clermont-Ferrand, France) 20 µl d'une solution aqueuse contenant HFIP et 20 µl d'une solution contenant le sévoflurane et le chloroforme (l'étalon interne) dans l'undécane. Ces solutions mères étaient concentrées de façon à ce que les solutions plasmatiques étalons finales étaient concentrées à 1, 5, 20, 50 et 150 µg/ml en sévoflurane et HFIP et 12 µg/ml en chloroforme (**Tableau 9**).

Les solutions plasmatiques obtenues ont été conditionnées dans des tubes headspace en verre de 20 ml (Antélia, France) fermés hermétiquement avec un bouchon de téflon étanche serti.

Solutions plasmatiques étalons	Concentration en sévoflurane et en HFIP(µg/ml)	1	5	20	50	150
Solutions mères dans l'undécane (20 µl ajoutées à 1 ml de plasma)	concentration en sévoflurane (µg/ml)	50	250	1000	2500	7500
	concentration en chloroforme (µg/ml)	600	600	600	600	600
Solutions mères aqueuses (20 µl ajoutées à 1 ml de plasma)	concentration en HFIP (µg/ml)	50	250	1000	2500	7500

Tableau 9 : Concentrations des solutions mères permettant la réalisation des 5 étalons de la gamme plasmatique

2.1.2. Appareillage

Nous avons utilisé un système Perkin Elmer (USA) composé de :

- Un système d'injection par espace de tête HS40[®]
- Un chromatographe phase gazeuse autosystem[®]
- Un spectromètre de masse Clarus 500[®]

Les 3 composantes du système sont interfacées ensemble et sont résumé par les initiales HS/GC/MS.

Le système est alimenté par de l'hélium N55 (Saga, France) comme gaz vecteur à une pression de 20 psi. Le débit de fuite du chromatographe était réglé à 20ml/mn.

La colonne choisie possédait une phase stationnaire Elite VMS (30m×1.4µm×0.25mmID), de composition déposée par Perkin-Elmer ayant une polarité intermédiaire et bien adaptée à la séparation de produits très volatiles de poids moléculaire faible comme le sévoflurane et le HFIP.

Les paramètres chromatographiques les plus importants ont été optimisés grâce à la réalisation d'un plan d'expérience comme détaillé en 2.1.3.

2.1.3. Optimisations chromatographiques

L'optimisation de l'analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et à l'injection headspace passe par le réglage de nombreux paramètres. Certaines contraintes sont imposées de par la nature des composés dosés. Un plan d'expérience nous a permis dans un second temps d'optimiser le paramétrage du système en se basant sur différents critères de qualités.

2.1.3.1. Contraintes imposées par la nature des molécules dosées

Le sévoflurane, molécule très lipophile, est peu retenue sur notre colonne qui est assez polaire. Ceci impose une température de début de cycle (<100°C) pour le four afin que le sévoflurane soit séparé des impuretés de bas poids moléculaires non retenues. Nous avons donc décidé de définir un plateau à faible température de 1.5 minute en début de cycle de température pour une meilleure séparation de ces molécules. Par contre, pour limiter le temps d'analyse, nous avons décidé d'établir un deuxième plateau à une température supérieure, le HFIP étant bien retenu sur la colonne. Enfin, pour éliminer le solvant de dilution du sévoflurane qui est énormément retenu, nous avons établi un troisième plateau à 200°C pendant 1.5 minute (**Figure 19**).

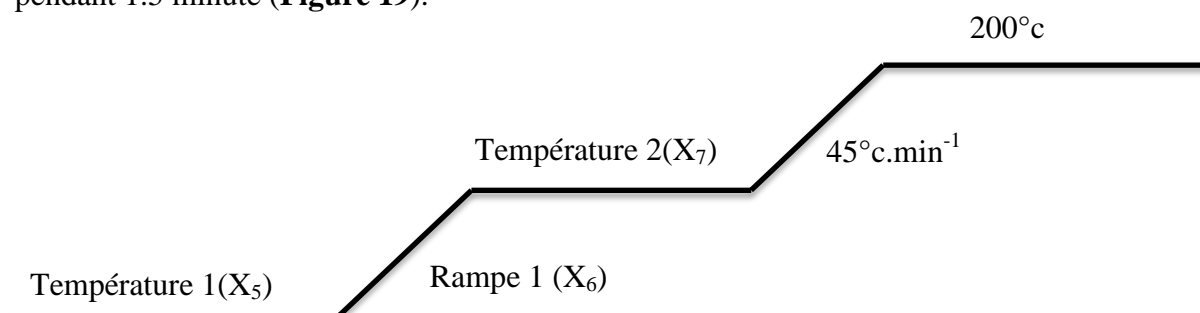


Figure 19 : allure globale de la courbe de température (avec entre parenthèses les variables correspondantes aux paramètres optimisés par le plan d'expérience: Voir chapitre suivant)

2.1.3.2. Optimisation par un plan d'expérience :

Afin de déterminer le meilleur compromis parmi les nombreux paramètres réglables du système tout en limitant le nombre d'essais nécessaires, nous avons réalisé un plan d'expérience basé sur une matrice d'Hadamard à 7 variables. Cette matrice nous a permis de définir les conditions expérimentales de 8 essais (**Tableau 10**) permettant l'étude de l'influence de 7 paramètres chromatographiques sur 4 réponses décisives influençant la sensibilité, la rapidité et la fiabilité de la méthode. Ces paramètres (notés de X_1 à X_7) ainsi que leurs amplitudes de variation entre parenthèses et ces réponses (notées de R_1 à R_4) sont les suivants :

Paramètres :

- X_1 : température de thermostatisation du système headspace (65–75°C)
- X_2 : durée de thermostatisation du système headspace (10–20 min)
- X_3 : temps de pressurisation du système headspace (2–6 min)
- X_4 : durée d'injection headspace (0.2–0.3 min)
- X_5 : température de départ du cycle de température du four (60–80°C)
- X_6 : importance de la rampe de température du four (25–45°C.min⁻¹)
- X_7 : température du four au plateau (125–175°C)

Réponses :

- R_1 : résolution entre le pic chromatographique du sévoflurane et celui du chloroforme.
- R_2 : efficacité sur le pic de sévoflurane estimée par le calcul de la hauteur équivalente de plateau théorique.
- R_3 : sensibilité/limite de quantification, basé sur l'aire des pics chromatographiques des analytes.
- R_4 : temps d'analyse, basé sur le temps de rétention du HFIP, molécule la plus retenue sur notre colonne.

Essais	X ₁ (°C)	X ₂ (min)	X ₃ (min)	X ₄ (min)	X ₅ (°C)	X ₆ (°C.min-1)	X ₇ (°C)
1	75	20	6	0,2	80	25	125
2	65	20	6	0,3	60	45	125
3	65	10	6	0,3	80	25	175
4	75	10	2	0,3	80	45	125
5	65	20	2	0,3	80	45	175
6	75	10	6	0,2	60	45	175
7	75	20	2	0,3	60	25	175
8	65	10	2	0,2	60	25	125

Tableau 10 : conditions expérimentales des 8 essais du plan d'expérience

Nous avons réalisé ces 8 expériences sur une solution plasmatique contenant 20 µg/ml de sévoflurane et HFIP et 12 µg/ml d'étalon interne (Chloroforme).

Ensuite, les réponses ont été calculées pour chaque essai et les effets respectifs évalués par la construction de diagramme de Pareto cumulés (voir 2.2.1). Ces diagrammes permettent de matérialiser dans quelle proportion chaque facteur influe sur les réponses afin de faire ressortir pour chacune les paramètres primordiaux pour son optimisation.

2.1.4. Spectrométrie de masse

Dans un premier temps nous avons réalisé un scan des ions de rapport m/z entre 60 et 400 pour les 3 molécules à quantifier. A partir de ces spectres de masse, nous avons déterminé 3 séquences de SIM pour chaque molécule comportant chacune 3 ions analysés.

2.1.5. Validation de la technique

2.1.5.1. Spécificité

La spécificité du dosage était assurée grâce à deux paramètres :

- Le temps de rétention chromatographique
- Le spectre de masse des molécules à ce temps et le choix d'ions non-présents dans le bruit de fond lors de la définition des séquences SIM (voir paragraphe 1.2.1.3 de la partie bibliographique) du spectromètre de masse.

2.1.5.2. Courbe d'étalonnage et linéarité

Selon le paragraphe 2.1.1, la courbe d'étalonnage était composée de 5 points de gamme allant de 1 à 150 µg/ml en sévoflurane et HFIP et 12 µg/ml en chloroforme. La quantification a été réalisée par la technique de l'étalonnage interne. L'établissement de la courbe d'étalonnage

moyenne (rapport de l'aire du pic des analytes sur celle de l'étalon interne en fonction de la concentration théorique) calculée sur la répétition (n=5) des dosages des 5 points de gamme nous a permis le calcul du coefficient de détermination pour estimer la linéarité de la technique de dosage.

2.1.5.3. Précision et exactitude

En accord avec les recommandations de l'ICH Q₂R₁, trois niveaux de concentration contenus dans la gamme ont été choisis pour évaluer ces paramètres : 1, 5 et 150 µg/ml en sévoflurane et en HFIP.

La précision a été évaluée par

- La répétabilité : répétition le même jour du dosage des 3 niveaux de concentration (n=5) et calcul du coefficient de variation sur les valeurs du dosage ainsi que l'écart par rapport à la valeur théorique pour chaque dosage. Un maximum de 10% est toléré pour ces valeurs.
- La fidélité intermédiaire : elle est également basée sur la répétition des dosages des 3 niveaux de concentration mais cette fois-ci 5 fois sur 5 jours, avec des solutions mères différentes chaque jour. Le coefficient de variation sur les valeurs du dosage ainsi que l'écart par rapport à la valeur théorique pour chaque dosage sont calculés. Un maximum de 10% est toléré pour ces valeurs.
- L'exactitude : elle correspond à l'écart par rapport à la valeur théorique des dosages réalisés lors de l'étude de la fidélité intermédiaire.

2.1.5.4. Limite de quantification et de détection

En diluant progressivement nos solutions mères, nous avons déterminé la limite de quantification (plus petite concentration pour laquelle nous obtenons un coefficient de variation de moins de 15% sur la répétition du dosage, n=5) et la limite de détection (plus petite concentration pour laquelle le signal chromatographique est égal à plus de trois fois l'amplitude du bruit de fond) pour le sévoflurane et le HFIP.

2.1.6. Définition du mode de prélèvement

C'est une étape cruciale du dosage : en effet, pour la bonne réalisation de l'étude, il fallait définir une technique de prélèvement qui combine plusieurs caractéristiques importantes :

- La cinétique se réalisant sur de longues périodes, les prélèvements ont été réalisés par le personnel de jour mais aussi de nuit du service de réanimation. Afin d'assurer une bonne reproductibilité et précision de ces prélèvements il a fallu déterminer un protocole simple et rapide.

- Les composés dosés étant volatiles, le mode de prélèvement doit limiter au maximum toute perte d'analytes avant analyse.

Pour des raisons de facilité et de confort pour les patients, les anesthésistes souhaitaient pouvoir réaliser le prélèvement sur cathéter veineux au moyen de tubes à vide Vacutainer® (Becton-Dickinson, USA). Or, des travaux tels que ceux de Yang *et al*⁴ montrent une perte relativement importante pour le sévoflurane dans ce genre de tubes due à l'espace résiduel (environ 0.7ml pour un volume de 5 ml de liquide) qui reste après le prélèvement et dans lequel se vaporisent les analytes.

Nous avons donc, en amont de la réalisation de l'étude clinique, validé la pertinence d'un tel mode de prélèvement et son influence sur la précision et la justesse des résultats futurs.

Par la même étude, nous avons également essayé de déterminer s'il était préférable de travailler sur le sang total ou sur le plasma sanguin. Nous avons donc réalisé les prélèvements suivants (chaque prélèvement réalisé en triple) sur le premier patient inclus dans l'étude clinique afin de les comparer entre eux :

- 1 ml de sang total prélevé dans une seringue à gaz du sang (sans air) puis transféré dans un tube headspace avec 20µl de solution d'étalon interne et hermétiquement scellé (n=3)

- 1 ml de sang total prélevé dans un tube à vide (avec air résiduel) puis transféré dans un tube headspace avec 20µl de solution d'étalon interne et hermétiquement scellé. (n=3)

- 1 ml de plasma obtenu par centrifugation du sang total prélevé dans une seringue à gaz du sang (sans air) puis transféré dans un tube headspace avec 20µl de solution étalon interne et hermétiquement scellé. La seringue a été placée directement à l'intérieur de la centrifugeuse sans transférer le contenu dans un tube, évitant ainsi l'exposition à l'air. Puis 1 ml de plasma a été transféré rapidement dans le tube headspace. (n=3)

- 1 ml de plasma obtenu par centrifugation du sang total dans un tube à vide et l'échantillon puis transféré dans un tube headspace avec 20µl de solution étalon interne et hermétiquement scellé. (n=3)

2.1.7. Premiers essais chez le patient de réanimation

Nous avons réalisé le dosage du sévoflurane et du HFIP dans les conditions de l'essai clinique afin d'évaluer notre méthode dans des conditions réelles. 10 prélèvements ont été réalisés pendant et après une administration de 48h de sévoflurane à 1.5% dans l'air exhalé (avant le début de l'inhalation, 5 minutes, 1, 24, 48 heures pendant, 5, 10, 30 minutes et 2 et 4 heures après) chez 6 patients. Le sévoflurane et le HFIP ont été quantifiés et les courbes concentration/temps établies.

2.1.1. Analyse des résultats des dosages

Le système HS/GC/MS est relié à un ordinateur sur lequel est installé le logiciel intégrateur : Turbomass® (Perkin Elmer, USA). Il permet l'édition du chromatogramme ainsi que la réalisation d'analyses qualitatives et quantitatives grâce à l'interprétation des spectres de masse.

Par ailleurs, les calculs additionnels ainsi que les courbes concentrations/temps pour les essais chez les patients ont été réalisés grâce au logiciel Excel (Microsoft, USA).

2.2. Résultats et discussion

2.2.1. Résultats du plan d'expérience

Les diagrammes de Pareto cumulés ont été construits (**Figure 20** : exemple de la réponse R3 : sensibilité/limite de quantification).

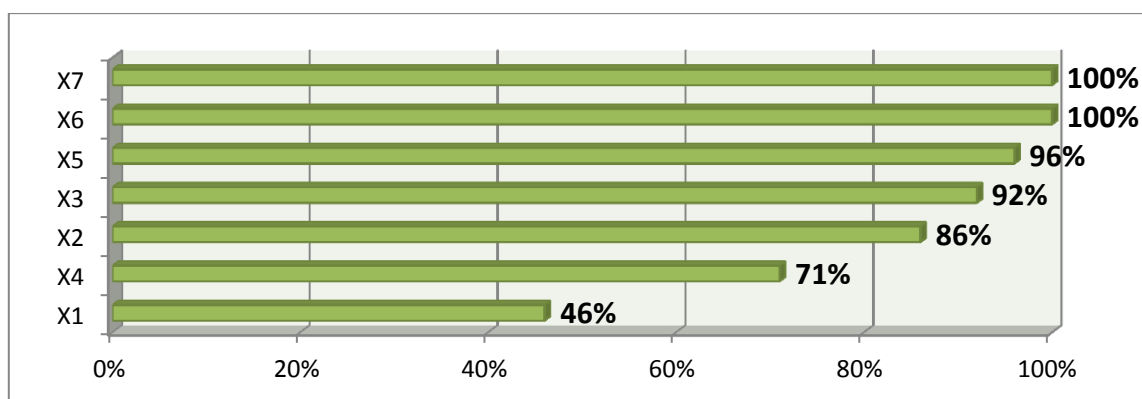


Figure 20 : Diagramme de Pareto pour la réponse R3 sensibilité/limite de quantification (X1 : Température du four du Headspace; X2 : Durée de thermostatisation. X3 : Durée de pressurisation ; X4 : Durée d'injection ; X5 : Température de départ du cycle de température ; X6 : importance de la rampe de température du four ; X7 : Température de fin du cycle de température)

Ainsi, pour R3 (sensibilité de l'analyse), la variation de X1 (la température du four headspace), X4 (la durée d'injection headspace) et X2 (la durée de thermostatisation) suffit à expliquer 86% de la variation de cette réponse. Le choix de ces paramètres est donc décisif pour l'amélioration de la sensibilité.

Nous avons réalisé les diagrammes de Pareto des 3 autres réponses étudiées et les résultats des coefficients Pareto sont compilés dans le Tableau 11 :

	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
Résolution sévoflurane/chloroforme (R1)	n.s.	-10%	n.s.	-25%	-60%	n.s.	n.s.
Efficacité sur le pic de sévoflurane (R2)	n.s.	-10%	n.s.	-47%	-34%	n.s.	n.s.
Sensibilité/limite de quantification (R3)	46%	15%	-6%	25%	n.s.	n.s.	n.s.
Temps d'analyse (R4)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-87%	-11%	n.s.

Tableau 11 : Valeurs des coefficients Paretos (en vert : les plus importants). Les coefficients inférieurs à 5% sont rendus non-significatifs (n.s.)

Une valeur négative du coefficient signifie qu'une augmentation du facteur entraîne une diminution de la réponse et inversement.

Ainsi, pour X2 (durée de thermostatisation du four headspace), une augmentation du paramètre entraîne une baisse de l'efficacité et de la résolution ainsi qu'une hausse de la sensibilité. Le même phénomène se produit pour X4 (durée d'injection headspace).

Nous avons choisi de privilégier une bonne sensibilité et un faible temps d'analyse pour notre méthode à une résolution et une efficacité importante. En effet, pour toutes les 8 expériences menées, la résolution a toujours été supérieure à 1.5 ce qui est suffisant et les pics chromatographiques restaient toujours fins et symétriques permettant ainsi une intégration rigoureuse. Nous avons donc choisi des valeurs plutôt fortes pour X1, X2 et X4 et une valeur plutôt faible pour X3 pour augmenter la sensibilité et diminuer la limite de quantification.

Pour le temps d'analyse, une température de début de cycle thermique chromatographique (X5) faible a été choisie malgré un rallongement du temps d'analyse afin de conserver un temps de rétention vers 2 minutes pour le sévoflurane et éviter les éventuelles interférences

d'impuretés éluées en début de chromatogramme. Une forte pente d'augmentation de température (X6) a été choisie afin d'accélérer l'élution des analytes et donc diminuer le temps d'analyse.

Les paramètres suivants ont donc été sélectionnés sont décrits sur la **Figure 21**:

Au niveau headspace :

- Température de four (X1) : 95°C
- Température d'aiguille : 110°C
- Température de ligne de transfert : 180°C
- Durée de thermostatisation (X2) : 20 minutes
- Durée de pressurisation (X3) : 3 minutes
- Durée d'injection (X4) : 0.03 minutes

Programme de température choisi :

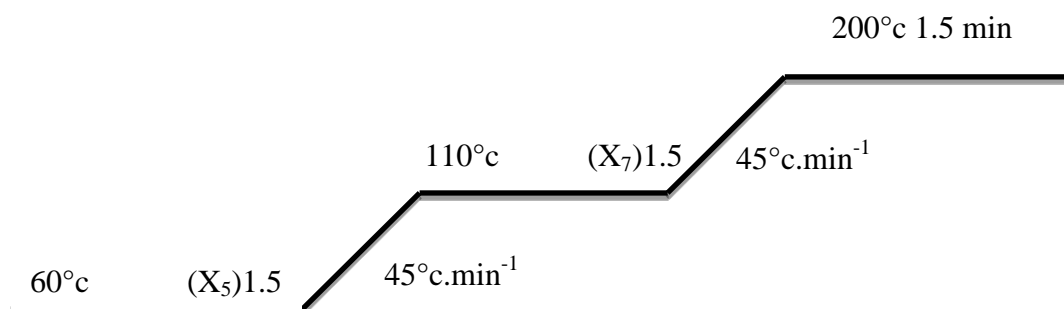


Figure 21 : courbe de température après optimisation (avec entre parenthèse les variables correspondantes aux paramètres optimisés par le plan d'expérience)

2.2.2. Validation de la méthode HS/GC/MS

2.2.2.1. Spectrométrie de masse : sensibilité et spécificité

Le spectromètre de masse permet d'assurer la spécificité de la technique ainsi que la sensibilité de celle-ci. En effet nous avons pu, grâce aux spectres de masses des molécules déterminer les ions caractéristiques des molécules à doser. Pour améliorer la sensibilité, nous nous sommes également attachés à choisir des ions non présents dans le bruit de fond au temps de rétention des produits

La spécificité de la spectrométrie influe également sur le temps d'analyse : en effet, lors des premiers essais de dosages qui ont été réalisés avec un FID (Flamme Ionization Detector), nous avons remarqué un pic chromatographique dû à l'acétone naturellement présente dans le sang proche de celui du sévoflurane nous obligeant à diminuer grandement la température de

départ du cycle de température pour bien les séparer. Avec la spectrométrie de masse, les masses choisies pour la séquence SIM du sévoflurane n'étant pas présentes parmi les masses des fragments de l'acétone, le pic chromatographique de l'acétone n'apparaît pas sur le chromatogramme du sévoflurane. Ceci nous permet donc de monter la température de départ sans interférence de l'acétone, réduisant ainsi le temps d'analyse.

La spécificité du dosage est donc assurée par le temps de rétention des molécules mais aussi par les ions choisis ainsi que leurs abondances relatives les uns par rapport aux autres.

Les rapports m/z choisis pour la réalisation des 3 séquences SIM ainsi que leurs proportions sont les suivants (**Figure 22**):

SIM1 (Sévoflurane): de 0 à 2.2 minutes : m/z 79 ; 131 ; 181

SIM2 (Chloroforme) : de 2.2 à 3.5 minutes : m/z 83 ; 85 ; 118

SIM3 (HFIP) : de 3.5 à 4.5 minutes : m/z 79 ; 99 ; 129

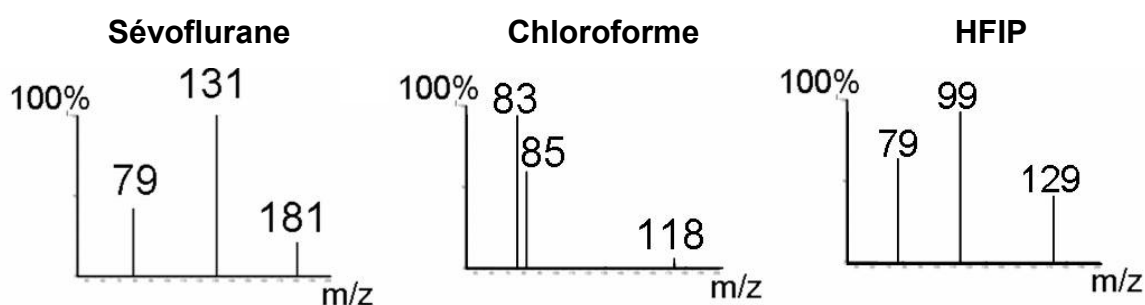


Figure 22 : ions choisis ainsi que leur abondance relative pour les 3 séquences SIM définies

2.2.2.2. Chromatogramme

Il est en fait constitué de 3 chromatogrammes correspondants aux 3 différentes séquences SIM. La méthode présente une efficacité importante comme le montre la finesse des pics (**Figure 23**) :

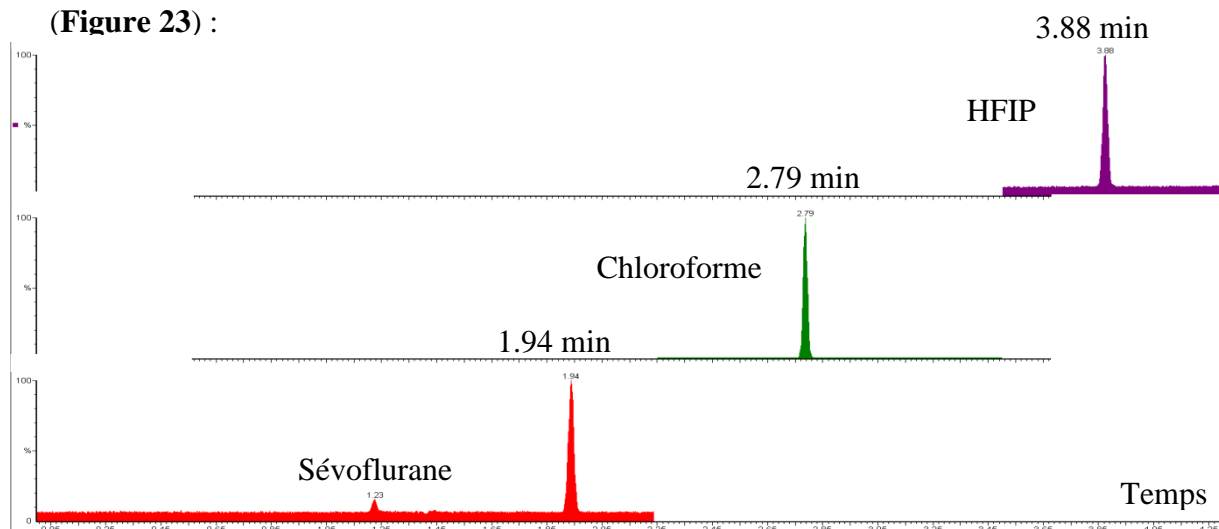


Figure 23 : Chromatogramme du sévoflurane, du HFIP et de leur étalon interne, le chloroforme

Les 3 produits sont par ailleurs très rapidement séparés car le temps d'analyse nécessaire pour la sortie du HFIP est inférieur à 4 minutes.

2.2.2.3. Rapidité d'analyse

Le temps d'analyse pour un échantillon unique est très court : 4 minutes pour le pic du HFIP pour un temps de 7.6 minutes pour le programme de température complet, ce qui fait 10.4 minutes de moins que pour la technique de dosage d'Accorsi *et al* ⁶⁴, seule technique publiée pour le dosage simultané du sévoflurane et du HFIP. Le temps total entre 2 analyses en incluant le retour à la température de début de cycle de température est lui de 12 minutes. Avec ceci notre méthode présente donc un avantage certain sur les techniques de dosage déjà publiées. Ce faible temps d'analyse rend possible le traitement des nombreux échantillons provenant de la réalisation d'une étude pharmacocinétique en un temps court.

2.2.2.4. Répétabilité et fidélité intermédiaire

Les valeurs des coefficients de variation et d'exactitude ont été déterminées lors des études de répétabilité et de fidélité intermédiaire et sont compilées dans le **Tableau 12**.

Analytes	Concentrations théoriques (µg/ml)	Fidélité intermédiaire				Répétabilité			
		Concentrations expérimentales (µg/ml)	écart type (µg/ml)	Coefficient de variation (%)	écart par rapport à la valeur théorique (%)	Concentrations expérimentales (µg/ml)	écart type (µg/ml)	Coefficient de variation (%)	écart par rapport à la valeur théorique (%)
sévoflurane	1	0.99	0.07	7.03	0.40	1.05	0.12	11.67	5.44
	20	20.09	1.01	5.04	0.47	18.99	2.09	11.01	5.03
	150	151.50	5.07	3.35	1.00	151.50	5.07	3.35	1.00
HFIP	1	1.11	0.11	9.75	10.80	1.14	0.10	8.72	14.44
	20	19.51	1.62	8.33	2.47	19.13	1.03	5.37	4.35
	150	145.69	7.42	5.09	2.88	150.11	8.82	5.87	0.07

Tableau 12 : Valeurs des coefficients de variations et des exactitudes (écarts par rapport à la valeur théorique) calculés sur les essais de fidélité intermédiaire et de répétabilité

Les valeurs obtenues sont acceptables (<10%) pour les 3 concentrations étudiées pour le sévoflurane. Pour le HFIP, le point 1µg/ml présente des valeurs légèrement supérieures à 10% sans pour autant dépasser 15% ce qui nous a permis de considérer cette concentration comme limite de quantification.

2.2.2.5. Limites de quantification et de détection

Les valeurs de limite de quantification retenues pour le sévoflurane et le HFIP libre plasmatiques sont de 1 µg/ml et les valeurs des limites de détection 0.2 µg/ml. Ces valeurs sont supérieures à celles retrouvées par Accorsi *et al*⁶⁴ (avec une limite de détection d'environ 0.001µg/l pour les deux analytes). Cependant, notre objectif était différent : Accorsi *et al*⁶⁴ a développé sa technique dans le but de quantifier les faibles taux présents dans le plasma et les urines des praticiens qui manipulent le sévoflurane⁶³. Pour ce faire, il utilise une méthode d'extraction particulière et onéreuse (Stir Bar Sorptive Extraction ou Headspace Sorptive Extraction) qui augmente grandement la sensibilité de l'analyse. Du fait des taux plasmatiques relativement importants retrouvés chez les patients traités, notre étude ne nécessite pas de tels seuils de détection. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser une extraction headspace classique pour réaliser notre étude pharmacocinétique.

2.2.3. Choix du mode prélèvement

Pour chaque mode de prélèvement, la moyenne l'écart type et le coefficient de variation ont été calculés (**Tableau 13**).

	sang total				Plasma			
	tube à vide		seringue à gaz du sang		tube à vide		seringue à gaz du sang	
	sévoflurane	hfip	sévoflurane	hfip	sévoflurane	hfip	sévoflurane	hfip
moyenne (µg/ml)	91,95	4,42	69,42	3,2	74,48	4,03	68,14	3,55
Ecart type (µg/ml)	12,62	0,61	14,24	0,61	6,4	0,3	2,08	0,23
coefficient de variation (%)	13,73	13,72	20,51	18,94	8,59	7,54	3,05	6,59

Tableau 13 : résultats des tests sur les matrices sang total et plasma

Ces résultats montrent les forts coefficients de variations (CV) retrouvés pour les dosages sur sang total (jusqu'à 20%). Ceux réalisés sur le plasma présentent une bien meilleure répétabilité (CV<9%) Ceci a été un argument en faveur du travail sur le plasma. De plus, la fixation érythrocytaire du HFIP, qui est non négligeable³⁶, est impossible à reproduire *in vitro* ce qui pose des problèmes pour l'éventuelle synthèse de solutions étalons dans le sang total.

Tout ceci ainsi que les problèmes pratiques liés à la coagulation du sang total nous a amené à travailler sur le plasma sanguin. La phase plasmatique étant d'autant plus intéressante qu'elle représente la phase biologiquement active des molécules.

Par ailleurs, la comparaison des dosages des prélèvements par tubes à vides avec ceux réalisés par seringues à gaz du sang sans air résiduel, montrent une faible différence (environ 10% de différence entre les 2) ce qui montre la faible incidence de l'espace résiduel dans les tubes à vide. Nous avons donc choisi de négliger cet effet. Cette faible valeur par rapport aux 17% de perte évoquées par Yang *et Al*⁴ peut s'expliquer par 2 paramètres :

La réfrigération des échantillons avant analyse augmente la solubilité des molécules dans le plasma : comme vu dans le paragraphe 1.2.2.1 de la partie bibliographique, le coefficient de partage gaz/sang du sévoflurane passe de 0.65 à 1.97 lorsqu'on abaisse la température de 37°C à 4°C⁷, ce qui est très en faveur de la dissolution du sévoflurane gazeux dans le sang et donc limite cette perte.

La rapidité de traitement et le soin apporté par le manipulateur à diminuer au maximum l'espace résiduel dans les tubes à vide sont également des facteurs de limitation de cette perte.

2.2.4. Etude préliminaire

Les profils pharmacocinétiques moyens (pour 6 patients) du sévoflurane et du HFIP pour une inhalation de 48h ont été construits sous Excel.

2.2.4.1. Sévoflurane plasmatique

La **Figure 24** correspond à la courbe moyenne des dosages du sévoflurane :

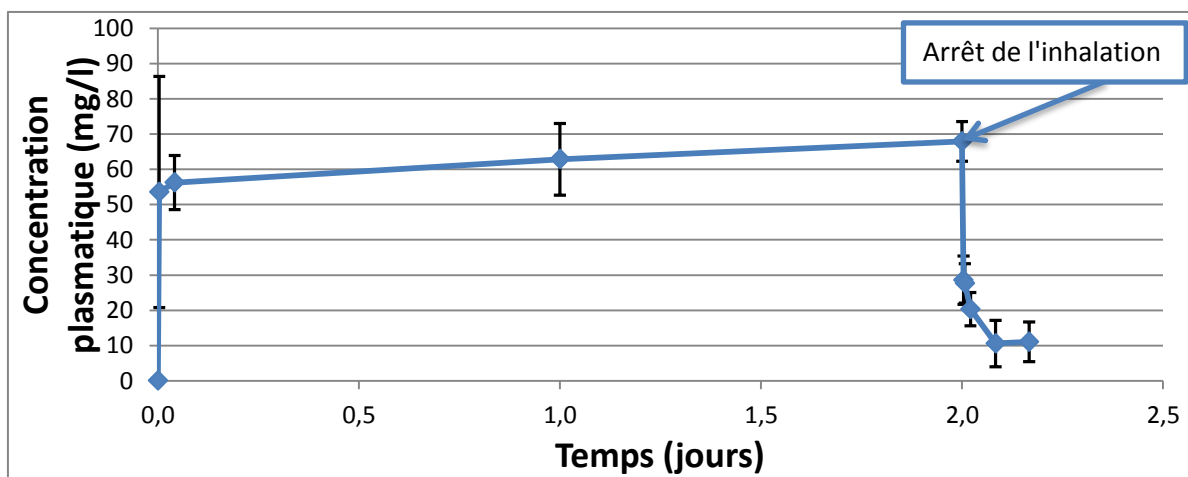


Figure 24 : Profil pharmacocinétique du sévoflurane plasmatique. Moyennes (n=6) \pm écart type

Le taux de sévoflurane plasmatique augmente très rapidement après le début de l'inhalation pour atteindre un plateau entre 60 et 70 mg/l et diminue de plus de la moitié du taux au plateau en moins de 5 minutes après l'arrêt de l'administration. Ceci confirme les propriétés intéressantes du médicament en termes de rapidité d'action : la cinétique rapide du produit est en accord avec la rapidité d'induction et de réveil des patients.

2.2.4.2. HFIP plasmatique

La **Figure 25** correspond à la courbe moyenne des dosages du HFIP en fonction du temps :

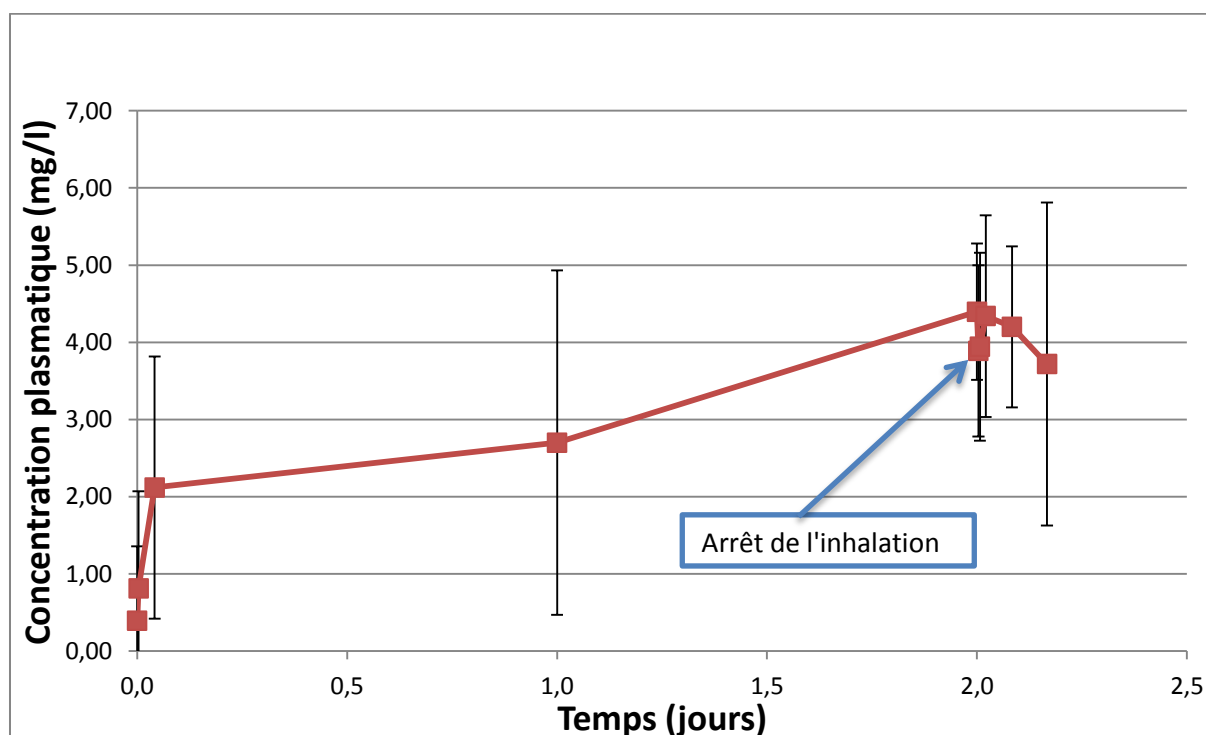


Figure 25 : Profil pharmacocinétique du HFIP libre plasmatique. Moyennes (n=6) \pm écart type

Les taux de HFIP libre ne dépassent pas 5 μ g/ml pendant toute la durée de la sédation. Il n'y a donc pas d'accumulation de ce métabolite dans le plasma des patients, ne leur faisant courir aucun risque de toxicité. Nous n'avons pas choisi, comme d'autres auteurs^{61,63,64}, de quantifier le HFIP total en introduisant une étape de déglucuronidation. En effet, la fraction libre du HFIP représente d'une part la fraction toxique de la molécule mais aussi la capacité de conjugaison à l'acide glucuronique de l'organisme du patient. Lors d'inhalation prolongée, nous pourrions assister à une saturation de processus entraînant une augmentation des taux de HFIP libre. De même, une saturation de la transformation du sévoflurane en HFIP se

traduirait par une augmentation du sévoflurane plasmatique et une diminution du HFIP. Ces paramètres sont donc évaluable par le dosage du HFIP libre.

De plus, Kharash *et al*^{33,35} a évalué la fraction libre à 15% du sévoflurane total. Nous pourrions donc estimer le HFIP total à partir du libre en nous appuyant sur ce pourcentage.

2.3. Conclusion sur la mise au point de la technique de dosage du sévoflurane et du HFIP

La technique que nous avons mise au point présente les caractéristiques nécessaires à la réalisation d'études pharmacocinétiques:

Cette technique permet de quantifier avec une bonne précision les deux molécules sur une large gamme de quantification. Le couplage HS/GC/MS permet de plus de garantir la spécificité de la méthode.

Ce travail a également permis de développer un protocole rigoureux de prélèvement des échantillons permettant de minimiser au maximum la perte de produit.

Enfin notre technique s'avère plus rapide et utilise un solvant de dilution moins toxique que la technique déjà publiée permettant le dosage simultané du sévoflurane et du HFIP⁶⁴.

Cette étape était la condition *sine qua non* du développement d'une étude pharmacocinétique rigoureuse dans le cadre d'un essai clinique.

Cette première partie du travail a fait l'objet de l'**article 1** présenté dans la partie « Publications internationales » de ce mémoire.

3. Réalisation de l'essai clinique (Article 2)

La deuxième étape de notre travail de thèse a porté sur la réalisation d'un essai clinique chez le patient en réanimation. Le but était de définir un modèle pharmacocinétique de l'administration du sévoflurane sur de longues périodes d'administration (48 heures) grâce au système AnaConDa et de calculer les paramètres qui le caractérisent. Ceci nous a également permis de vérifier si la pharmacocinétique du sévoflurane ou de son métabolite était inchangée lors de périodes d'administration supérieures à celle que l'on peut retrouver dans la bibliographie.

Parallèlement à cela, nous avons également cherché à évaluer la toxicité potentielle du produit en étudiant la libération de fluorures ainsi que l'évolution des paramètres de la fonction rénale.

3.1. Objectifs de l'étude

3.1.1. Objectifs primaires

- Etablir le profil pharmacocinétique des concentrations plasmatiques en sévoflurane et HFIP lors d'une administration de 48h pour sédation, avec le système AnaConDa.
- Evaluation des taux de fluorures plasmatiques et de la toxicité rénale lors de cette administration.

3.1.2. Objectifs secondaires

Nous pourrions déterminer l'influence du sexe, du poids, de la taille et de l'âge sur le comportement pharmacocinétique du sévoflurane.

3.2. Matériel et méthodes

Cette étude clinique intitulé «pharmacocinétique du sévoflurane lors d'une sédation sur 48h en réanimation avec le système AnaConDa : étude pilote » a fait l'objet d'un avis favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP Sud-Est VI) et de l'AFSSAPS.

3.2.1. Recrutement des patients

3.2.1.1. Critères d'inclusion

Les patients, issus du service de Réanimation Adulte du CHU de Clermont-Ferrand présentaient les critères suivant :

- Patients majeurs (âgés de plus de 18 ans)
- Patients de corpulence normale (BMI entre 17 et 27). Le volume de distribution des molécules dosées pouvant être grandement modifié par le volume graisseux des patients (voir paragraphe 1.8.2 de la partie bibliographique), il est nécessaire de recruter des patients ayant un poids ni trop élevé ni trop faible afin de limiter au maximum l'influence de ce paramètre sur la cinétique du médicament.
- Fonction rénale normale. Elle est estimée par une clairance de la créatinine supérieure à 70 ml/min
- Patients nécessitant une ventilation mécanique sous sédation pour une durée prévisible supérieure à 48h
- Patients ayant donné leur consentement éclairé selon les modalités décrites par la loi de santé publique du 9 août 2004. (si le patient n'est pas conscient au moment de l'inclusion, c'est une personne de confiance tel que le conjoint ou l'enfant qui accepte ou non de signer le formulaire de consentement et donc l'inclusion dans l'étude)
- Patients bénéficiant d'un régime de Sécurité Sociale

3.2.1.2. Critères de non-inclusion

Les patients présentant les caractéristiques suivantes ne pouvaient être inclus dans l'essai.

- Femmes enceintes
- Femmes allaitantes
- Hypersensibilité aux agents anesthésiques halogénés
- Refus du protocole
- Patients inclus dans un autre protocole ou en période d'exclusion
- Patients mineurs
- Patients ayant présenté des antécédents personnels ou familiaux d'hyperthermie maligne
- Insuffisance hépatocellulaire grave

3.2.2. Protocole anesthésique

Les patients satisfaisants aux critères d'inclusion dans l'étude ont bénéficié d'une intubation endotrachéale pour permettre leur ventilation mécanique. Une ligne artérielle radiale était également posée pour permettre d'une part l'injection de médicaments mais aussi les prélèvements pour les différents dosages plasmatiques réalisés. Avant et après la sédation par sévoflurane, le midazolam et le rémifentanyl ont été utilisés pour sédater les patients.

Afin d'atteindre un score de profondeur de sédation de Richmond entre -2 et -3 (voir paragraphe 1.7.5 de la partie bibliographique), une perfusion continue de rémifentanyl pouvait également être utilisée pour potentialiser l'action de sévoflurane²⁶. Cette perfusion concourrait également à atteindre la valeur de 5 pour l'échelle de douleur BPS (Behavioral Pain Score), valeur cible qui était fixée pour l'analgésie du patient⁷².

La stabilité hémodynamique des patients était contrôlée par la fréquence cardiaque et la pression sanguine. Les effets hémodynamiques dus aux variations de profondeur de sédation pouvant survenir lors du passage de la sédation par midazolam au sévoflurane étaient pris en charge par de l'épinephrine en perfusion.

Le sévoflurane a été utilisé pendant 48 heures avec le filtre AnaConDa : Une valeur de 1.5% de sévoflurane dans l'air expiré a été choisie afin de garantir une bonne sédation à tous les patients sans avoir à modifier cette dose selon les patients. Cette valeur de fraction inspirée, ainsi que la valeur de fraction expirée ont été vérifiées et enregistrées dynamiquement par un module d'analyse M1019A (Philips Healthcare, Andover, MA). Le filtre a été placé sur le circuit de ventilation mécanique en lieu et place du filtre échangeur de chaleur et d'humidité disposé dans un circuit respiratoire classique (voir paragraphe 3.1 de la partie bibliographique). Afin d'atteindre cette valeur de 1.5%, durant les 10 premières minutes d'inhalation, et pendant les heures suivantes, le praticien a utilisé un nomogramme fourni avec le dispositif médical basé sur les données de Belda *et al*⁴⁹ qui permet d'ajuster la vitesse du pousse-seringue en fonction du poids et du volume respiratoire du patient. Pour chaque patient, ce volume respiratoire est resté constant durant la durée de l'étude afin de ne pas entraîner de variation des quantités administrées en fonction du temps pour maintenir cette valeur de 1.5% dans l'air expiré⁷³. Les valeurs des vitesses du pousse-seringue ont été enregistrées au cours du temps pour permettre le calcul des quantités administrées nécessaires à la modélisation pharmacocinétique. Le fonctionnement du filtre AnaConDa n'est assuré par le fabricant que pendant 24h. Le filtre était donc changé 24h après le début de l'inhalation, juste après les prélèvements plasmatiques.

3.2.3. Protocole de prélèvement

Les prélèvements ont été réalisés sur la voie centrale veineuse selon le protocole déterminé lors du développement de la technique de dosage (article 1) : un tube à vide de 5 ml est rempli au maximum avec le sang veineux en prenant garde à limiter le plus possible l'air résiduel. Puis, après centrifugation à 5000 tours minutes pendant 3 minutes, un millilitre de plasma et 20 µl de solution d'étalon interne (choroforme à 600µg/ml) dans l'undécane sont introduits dans un tube headspace hermétiquement scellé. L'échantillon est ensuite congelé à -20°C avant analyse.

En nous basant sur les résultats des premiers dosages réalisés lors de la validation de méthode et afin de bien décrire l'évolution des concentrations avant, pendant et après l'inhalation du sévoflurane, nous avons défini 12 prélèvements répartis sur les 54h (48h d'inhalation et jusqu'à 6h après l'arrêt) que dure le suivi total des concentrations plasmatiques:

- 1 avant le début de la perfusion
- 2 pendant la phase d'initialisation de la perfusion : 5 min et 1h après le début de la perfusion (le point de départ du minutage était la détection du sévoflurane dans le circuit par le dispositif dynamique d'analyse)
- 3 pendant le plateau, quand les concentrations sont stables: 6h, 24h après le début de la perfusion, et juste avant de l'arrêter à 48h
- 6 dans la phase de décroissance, après l'arrêt de la perfusion : à 5 min, 10 min, 30 min, 2h, 4h et 6h après la fin de la perfusion. En effet c'est cette phase la plus importante pour la modélisation et le calcul des paramètres pharmacocinétiques.

Avant le début de la perfusion, 24 heures après le début et juste avant l'arrêt à 48 h, 2 tubes à vide supplémentaires ont été prélevés pour le dosage des fluorures plasmatiques.

La **Figure 26** résume les prélèvements réalisés.

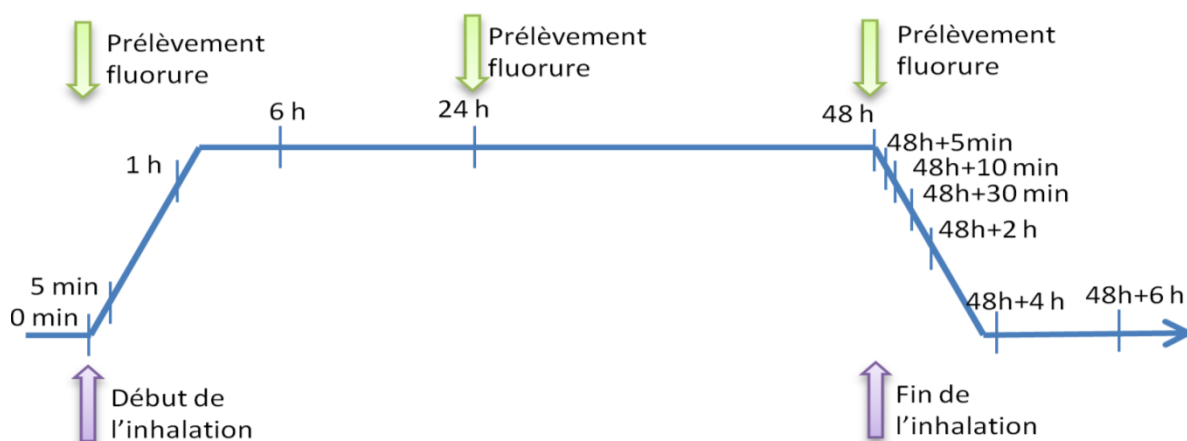


Figure 26 : matérialisation graphique du protocole de prélèvement

Au moment de chaque prélèvement sont relevés les éléments suivants :

- Le débit du pousse-seringue
- La fraction expirée en sévoflurane
- La fraction inspirée en sévoflurane

3.2.4. Nombre de patients inclus dans l'étude

La détermination *a priori* du nombre de patients permettant de garantir la significativité de nos résultats a été difficile du fait de la méconnaissance de la variabilité interindividuelle que nous étions susceptibles de trouver lors des dosages. Les analyses de puissances réalisées pour déterminer la taille de l'échantillonnage nécessaire pour détecter une différence significative des résultats au cours du temps de l'étude ont montrées que 12 patients suffisaient pour déterminer un intervalle de corrélation interclasse proche de 0,9 avec un intervalle de confiance de 0,2 : test réalisé grâce à la fonction ANOVA à 2 facteurs avec répétition d'expérience et une puissance de 85% ⁷⁴.

3.2.5. Dosage du sévoflurane du HFIP et des fluorures

3.2.5.1. Dosage du sévoflurane et du HFIP

Nous avons appliqué la technique de dosage décrite dans le paragraphe 1.1 de cette partie expérimentale.

3.2.5.2. Dosage des fluorures

Le métabolisme hépatique du sévoflurane entraîne la formation de HFIP et d'ions fluorures. Une toxicité rénale induite par les fluorures a déjà été mise en évidence avec le méthoxyfurane^{42,43,44} métabolisé au niveau rénal (voir paragraphe 2.2.3 de la partie bibliographique). Les taux toxiques plasmatiques retrouvés dans ces études étaient de 50µg/ml mais pour le Sévoflurane. Le métabolisme hépatique de la molécule fait que l'on peut retrouver des taux supérieurs, sans détecter de toxicité rénale chez les patients lors de courtes durées d'inhalation. Sur des inhalations de 48 heures, il est donc important de contrôler l'évolution de ces paramètres en parallèle du contrôle de la fonction rénale des patients.

La méthode de dosage a été validée selon les recommandations de l'ICH (QR2 : voir le paragraphe 1.2.3 de la partie bibliographique) :

- La spécificité a été assurée grâce à l'utilisation d'une électrode spécifique au fluor connectée sur un ionomètre Sevenmulti® (Mettler Toledo, Viroflay, France).
- La précision et l'exactitude ont été évaluées et validées avec un seuil de 10% pour les coefficients de variation et les écarts par rapport aux valeurs théoriques. Le **Tableau 14** synthétise les résultats de ces études.

Concentrations théoriques (µg/ml)	Répétabilité				Fidélité intermédiaire			
	Concentrations expérimentales (µg/ml)	écart type (µg/ml)	Coefficient de variation (%)	écart par rapport à la valeur théorique (%)	Concentrations expérimentales (µg/ml)	écart type (µg/ml)	Coefficient de variation (%)	écart par rapport à la valeur théorique (%)
5,00	5,01	0,04	0,72	0,16	4,98	0,45	9,02	-0,44
25,00	25,10	0,13	0,53	0,41	25,01	2,14	11,01	0,05
70,00	69,61	0,41	0,59	-0,56	70,10	4,25	3,35	0,14

Tableau 14 : Valeurs des coefficients de variations et des exactitudes (écarts par rapport à la valeur théorique) calculés sur les essais de fidélité intermédiaire et de répétabilité pour le dosage des fluorures plasmatiques

- Nous avons fixé un seuil de quantification à 1µmol/l de plasma ce qui selon la littérature est suffisant pour quantifier la libération de fluorures lors d'inhalation de sévoflurane^{45,46,47}.

3.2.6. Suivi de la tolérance rénale

La toxicité rénale potentielle du sévoflurane a été évaluée durant l'étude par le dosage plasmatique de l'urée et de la créatinine. Les résultats de ces 2 dosages, qui font partie du suivi journalier normal des patients de réanimations, ont été enregistrés tous les jours à partir du début de l'inhalation et jusqu'à 5 jours après l'arrêt de celle-ci. La survenue d'une toxicité rénale est définie par les critères de l'Acute Kidney Injury Network (AKIN) ⁷⁵.

3.2.7. Calcul des paramètres pharmacocinétiques

3.2.7.1. Calcul des doses administrées

Afin de réaliser le calcul des paramètres pharmacocinétiques, il est nécessaire de calculer la dose réellement absorbée par le patient en fonction du temps. En effet, le filtre AnaConDa recyclant le sévoflurane exhalé par le patient, qui est ensuite re-inhalé, il s'opère un équilibre dans le circuit respiratoire entre le sévoflurane réellement absorbé par le patient et celui qui est éliminé par voie pulmonaire. Globalement, le système se comporte comme un circuit fermé dont les seules fuites sont :

- Le sévoflurane effectivement absorbé par voie pulmonaire puis métabolisé et éliminé
- Le sévoflurane qui traverse le filtre au charbon de l'AnaConDa : Meiser *et al*⁸ a évalué à 90% la capacité de recyclage du dispositif.

L'air présent dans le circuit respiratoire étant maintenu à 1.5% en sévoflurane, le sévoflurane apporté par le pousse-seringue compense donc la perte dans le circuit générée par l'absorption pulmonaire du produit et par la fuite de 10% au niveau du filtre. Donc, nous avons calculé la dose absorbée en fonction du temps par le calcul de la quantité de sévoflurane injecté par le pousse-seringue moins 10% de perte.

3.2.7.2. Modélisation pharmacocinétique

Grâce au logiciel de pharmacocinétique Kinetic Pro (Wgroupe, France) et le calcul des doses administrées en fonction du temps, nous avons pu déterminer le modèle pharmacocinétique le plus approprié pour modéliser notre administration et calculer les paramètres pharmacocinétiques le décrivant : la constante d'absorption (K_a), les constantes d'échange intercompartimentales (K_{1-2} et K_{2-1}), le volume de distribution (V_d), la constante d'élimination totale (K_e), la clairance plasmatique (Cl_p) le temps de demie vie ($T_{1/2}$) et les concentrations plasmatiques calculées par le modèle. Le critère de choix du modèle

pharmacocinétique le plus approprié pour décrire les concentrations trouvées lors des dosages plasmatiques était l'erreur résiduelle du modèle pharmacocinétique calculé par le logiciel : ceci représente sous la forme d'un pourcentage, la quantité d'information non expliquée par le modèle calculé par rapport aux résultats expérimentaux.

3.3. Résultats discussion

3.3.1. Déroulement de l'étude

Notre étude est à notre connaissance la première ayant étudié les taux plasmatiques en sévoflurane et en HFIP pendant de longues durées d'inhalation employant le système AnaConDa.

L'utilisation du dispositif s'est révélée simple et n'a pas posé de problème particulier de réglage : en effet, les réglages du débit du pousse-seringue en début d'inhalation sont déterminés selon le nomogramme décrit par Belda *et al* ⁴⁹ qui permet l'ajustement du pousse seringue en fonction de la fraction expirée désirée et du poids du patient. Ensuite une simple surveillance toutes les heures est suffisante ⁷⁶ afin de vérifier la stabilité de la fraction expirée pour ajuster le cas échéant le débit du pousse seringue.

12 patients (9 hommes, 3 femmes) ont été inclus dans l'essai clinique. L'âge moyen était de 54 ± 12 ans. Les patients étaient hospitalisés dans le service pour raisons post-chirurgicales (5 patients) et médicales (7 patients).

3.3.2. Calcul de la quantité de sévoflurane absorbée par les patients

Ces données, cruciales pour le calcul des paramètres pharmacocinétiques ont été déterminées pour chaque patient et pour chaque intervalle de temps entre les différents prélèvements (**Tableau 15**).

	0-5 mn	5-10 mn	10 mn-1h	1-6 h	6-24 h	24-48 h	total
Vitesse moyenne du pousse seringue (ml/min)	22,5	17,8	11,8	10,1	9,5	8,7	
volume moyen injecté (ml)	2	1,7	9,3	45,3	159,6	186,5	404,3
volume moyen injecté moins 10% de perte au niveau du filtre (ml)	1,8	1,5	8,4	40,8	143,6	167,8	363,9
poids moyen de sévoflurane absorbé (g)	2,6	2,2	12,4	60,1	211,5	247,2	536
écart type (g)	0,9	0,9	3,5	13,9	34,2	53	89,5
CV(%)	35%	41%	28%	23%	16%	21%	17%

Tableau 15 : quantité de sévoflurane moyenne absorbée par les patients (n=12). CV : Coefficient de Variation

Les coefficients de variation sont très importants dans les premières minutes de l'administration. En effet, au début de la perfusion, la vitesse du pousse-seringue nécessaire à l'obtention d'une fraction expirée de 1.5% est réglée à partir du nomogramme et est fonction de paramètres inhérents aux patients tels que le poids. Ceci explique la forte variabilité interindividuelle des doses administrées. Au final, les quantités sont relativement homogènes puisque le coefficient de variation n'est que de 17% sur les quantités totales moyennes absorbées.

3.3.3. Cinétiques plasmatiques

La première étape de notre travail a été de construire le profil pharmacocinétique des 2 analytes lors de l'administration étudiée à partir des résultats des dosages des 12 patients inclus dans l'essai clinique (**Figure 27**).

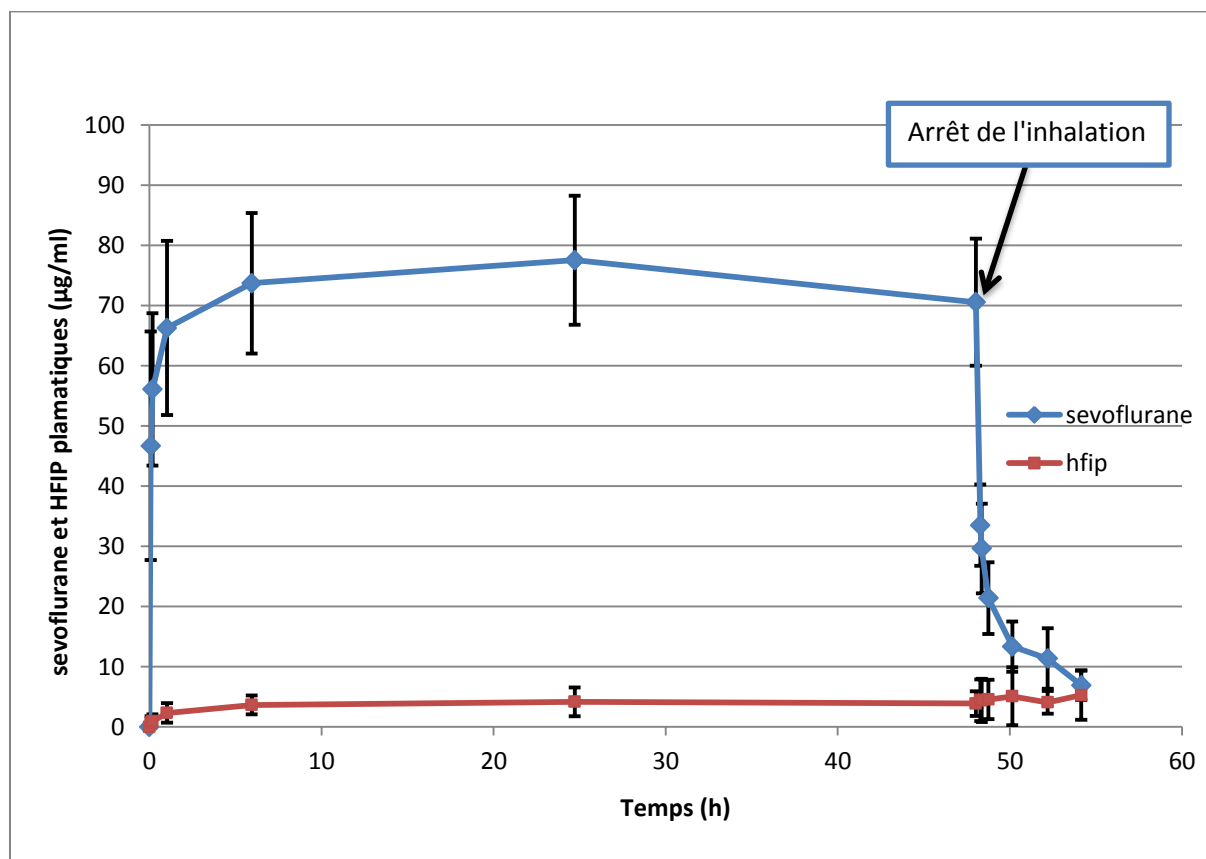


Figure 27 : Profils pharmacocinétiques expérimentaux moyens du sévoflurane et du HFIP durant l'inhalation et jusqu'à 6 heures après l'arrêt. (Moyennes \pm écarts types)

Les concentrations moyennes de sévoflurane ont été $77,5 \pm 10,7$ mg / l à 24 h et $70,5 \pm 10,5$ mg / l à 48 h. Ces deux valeurs sont proches et ne diffèrent pas statistiquement au risque de

5% l'une de l'autre ($p = 0,183$). Ces images montrent la cinétique rapide de l'halogéné : la croissance plasmatique est très rapide, comme l'avait montré Stureson *et al* ²⁹. En effet, pendant la croissance plasmatique nous observons une augmentation très rapide des concentrations (80% de la concentration plasmatique maximale qui est de 77.5 mg/l à 24 h sont atteints en 33 minutes, 85% de Cmax à 1h et 94% à 6h). Nous observons également, à partir de l'arrêt de l'inhalation une décroissance très rapide des concentrations plasmatiques montrant la rapidité d'élimination du produit. Malheureusement, dans notre étude, tous les patients nécessitaient une sédation complémentaire à la fin du protocole de sédation par inhalation de sévoflurane de 48h. Celle-ci a été prise en charge par le propofol par voie intraveineuse de telle sorte que nous n'avons pas pu corréler la rapidité de réveil avec la rapidité d'élimination du sévoflurane. Néanmoins, Mesnil *et al* ⁵⁷ a récemment étudié ce paramètre pour le sévoflurane par AnaConDa versus le propofol ou le midazolam dans une étude randomisée portant sur 60 patients (20 patients pour chaque branche) pour des durées supérieures à 24h de sédation (durée moyenne d'environ 50 heures). Il a montré que le temps de réveil était significativement plus court ($p < 0.001$) avec le sévoflurane qu'avec le propofol et le midazolam (18.6 ± 11.8 min pour le sévoflurane contre 91.3 ± 35.2 min pour le propofol et 260.2 ± 150.5 min pour le midazolam) ce qui corrobore nos observations sur la rapide décroissance plasmatique du sévoflurane. La rapidité de réveil, avantage reconnu du sévoflurane en sédation, semble donc conservée lors de longues durées d'utilisation.

La quantification du sévoflurane plasmatique est la seule technique permettant d'obtenir avec précision les valeurs des concentrations nécessaires aux calculs pharmacocinétiques : en effet, la simple mesure de la fraction expirée, qui était de 1.5% pour tous les patients correspond une valeur de 77 ± 10.5 mg/l et comme le montre la **Figure 28**, un même protocole donne des cinétiques plasmatiques variables chez les patients.

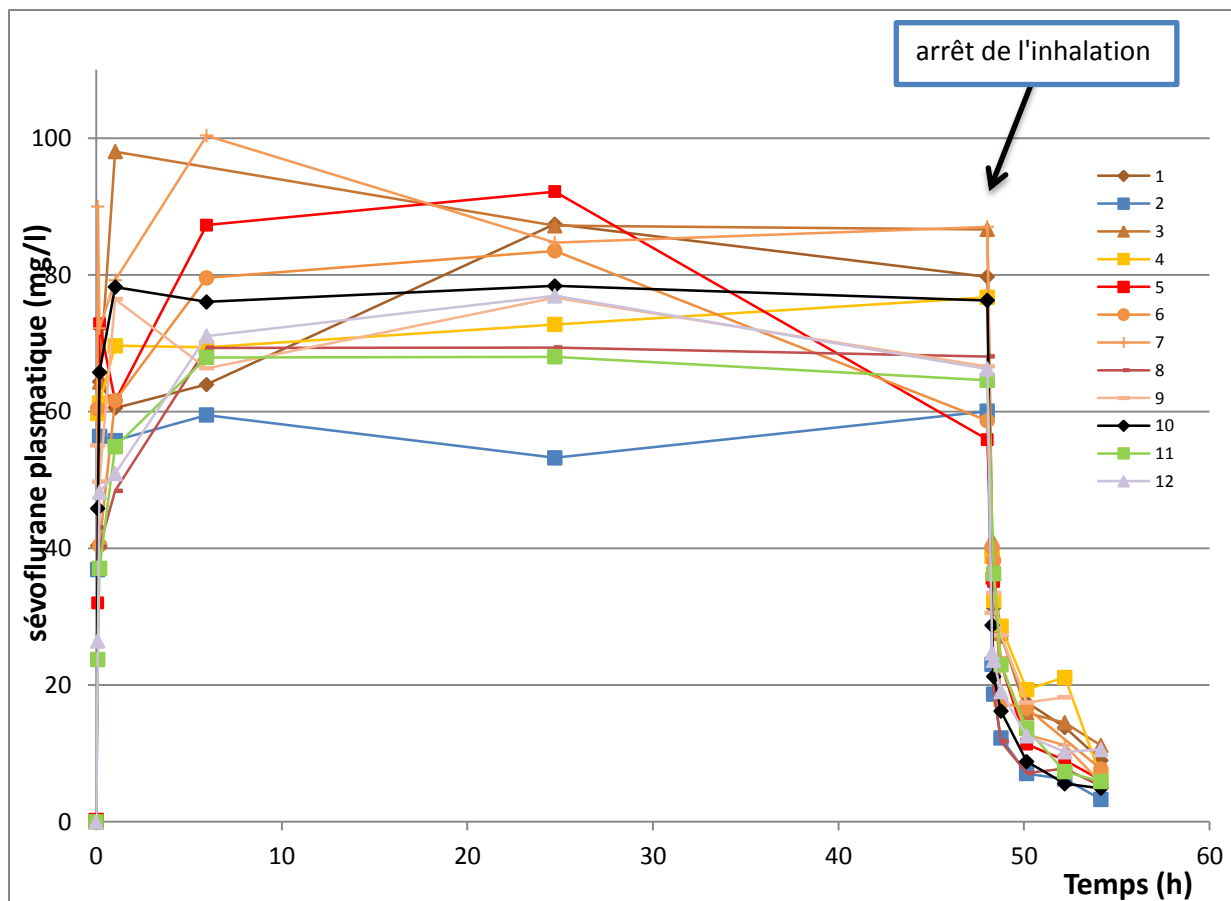


Figure 28 : visualisation de la variabilité sur les cinétiques individuelles des 12 patients inclus

L'origine de ces variations est multiple et nous n'avons pas pu mettre en évidence de paramètres pouvant expliquer de telles variations. En effet, les influences du poids, de la taille de l'âge et de la répartition en graisse des patients mais aussi des pathologies sous-jacentes dont ils souffrent ou les traitements co-prescrits ont été évalué sans avoir pu être statistiquement démontrées. Ceci rend difficile l'extrapolation de la concentration plasmatique en sévoflurane par la simple mesure de la fraction expirée. Une étude sur un plus grand nombre de patients pourrait permettre de préciser ceci.

Lors de la décroissance, les taux sont par contre relativement homogènes entre les patients comme le montre la **Figure 29**. La fraction expirée (Fe) semble par ailleurs un bon indicateur de l'élimination de l'halogéné et est bien corrélée avec les concentrations plasmatiques déterminées.

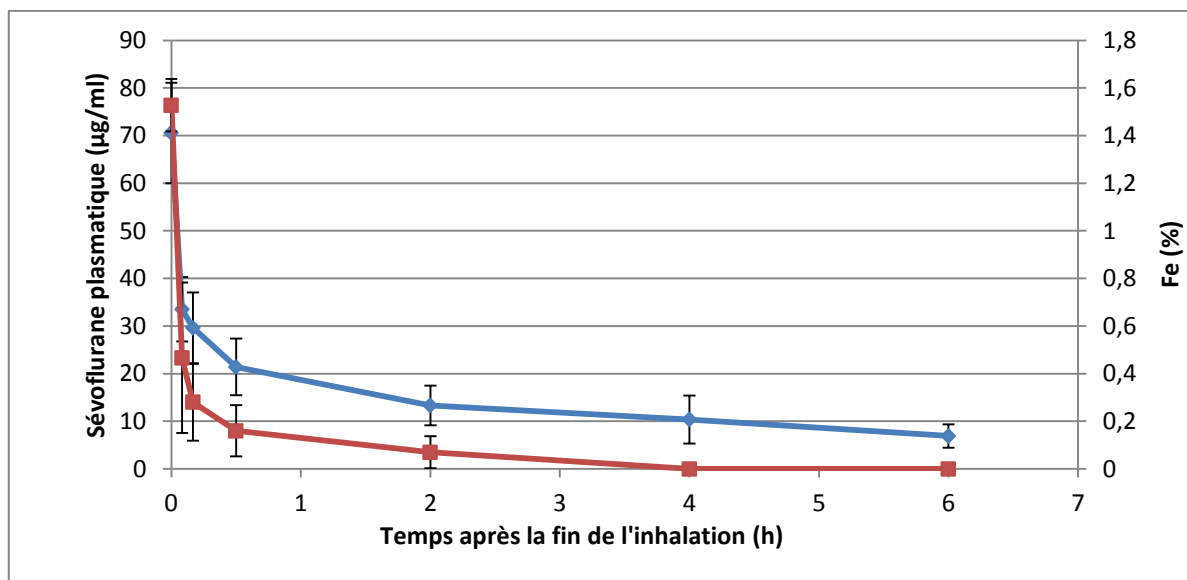


Figure 29 : décroissance de la Fe (en rouge) et des concentrations en sévoflurane (en bleue) après l'arrêt de l'inhalation (Moyennes \pm écarts types)

Néanmoins nous remarquons que la sensibilité de l'analyseur dynamique du gaz dans la fraction expirée ne permet pas de détecter le sévoflurane plasmatique résiduel à 6h après arrêt de l'inhalation (environ 7 µg/ml), la valeur donnée étant de 0%.

Les valeurs de HFIP plasmatique restent faibles pendant toute la durée de l'étude. Comme observé précédemment^{34,35} le métabolisme du sévoflurane est très rapide puisque l'on détecte le HFIP dans le plasma des patients dès le premier prélèvement 5 minutes après le début de l'inhalation (**Figure 27**). A aucun moment durant l'étude n'apparaît une accumulation de HFIP libre signant soit une saturation du processus de conjugaison avec l'acide glucuronique, soit une diminution globale de l'élimination du métabolite.

3.3.4. Paramètres pharmacocinétiques

Afin de modéliser la pharmacocinétique du sévoflurane, nous avons utilisé les concentrations moyennes en sévoflurane obtenues par le dosage des prélèvements des 12 patients inclus. Ces valeurs constituent pour le logiciel Kinetic Pro les valeurs cibles auxquelles il va comparer les valeurs obtenues en appliquant les modèles pharmacocinétiques qu'il teste.

Les quantités moyennes absorbées par voie pulmonaire par intervalle de temps sont également fournies à Kinetic Pro afin que celui-ci calcule les paramètres pharmacocinétiques qui décrivent le modèle.

3.3.4.1. Choix du modèle pharmacocinétique

Nous avons testé dans le logiciel plusieurs modèles pharmacocinétiques et celui qui semblait le mieux correspondre avec une erreur résiduelle de seulement 7% était celui à 2 compartiments. Plusieurs études publiées ^{77,78} ont également choisi un modèle à 2 compartiments. La **Figure 30**, capture d'écran de Kinetic Pro représente sous forme graphique la performance du modèle pharmacocinétique calculé.

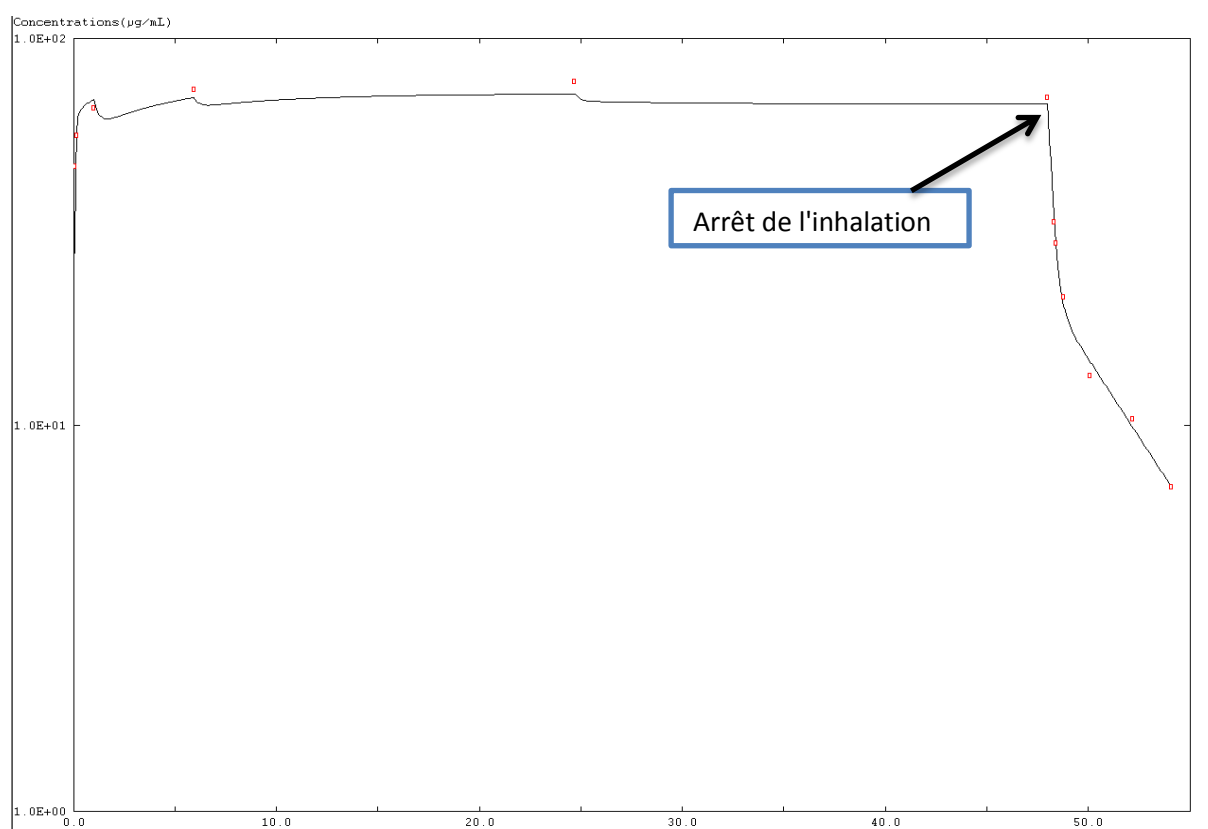


Figure 30 : copie d'écran du logiciel Kinetic Pro montrant l'adéquation entre le modèle pharmacocinétique calculé (trait noir) et les points expérimentaux (en rouge)

La courbe (en noir) des concentrations calculées est proche des valeurs expérimentales (en rouge). L'estimation de l'erreur résiduelle de 7% est faible et est à ramener à l'erreur sur la méthode de dosage, estimée lors de l'étude de fidélité intermédiaire lors de la validation. La méthode a été validée avec des coefficients de variation entre 5 et 10 % ce qui fait que l'erreur

générée par le modèle semble négligeable et le modèle fiable et décrivant bien l'administration.

La représentation graphique en coordonnées semi-logarithmiques de la courbe concentration/temps calculée par Kinetic Pro permet de visualiser sous la forme de deux droites les deux phases de décroissance correspondantes aux deux compartiments du modèle. En effet, l'équation des concentrations en fonction du temps est du type bi-exponentiel dans le cas d'un modèle bicompartimental (**équation 1**). Le logarithme de ces valeurs donne donc des droites.

$$C(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

Avec:

C(t): concentration plasmatique

A, α , B, β : macro constantes du modèle

Equation 1 : équation des concentrations en fonction du temps pour un modèle bicompartimental

3.3.4.1. Paramètres pharmacocinétiques du modèle

Les valeurs des paramètres pharmacocinétiques calculés par kinetic pro à partir de la cinétique moyenne et les quantités moyennes de sévoflurane absorbées par les patients sont résumées dans le **Tableau 16**.

	V _d (l)	K _e (h ⁻¹)	K ₁₋₂ (h ⁻¹)	K _{2,1} (h ⁻¹)	T _{1/2} (h ⁻¹)	Cl _{pl} (l.h ⁻¹)
Notre étude	53	2,9	1,2	0,26	3,78	156
Kharash et al³⁵	42	N.C.	N.C.	N.C.	2,8	32

Tableau 16 : paramètres pharmacocinétiques du modèle (V_d: Volume de distribution, K_e, constante d'élimination, K₁₋₂: constante de transfert du compartiment central vers le compartiment périphérique, K₂₋₁: constante de transfert du compartiment périphérique vers le compartiment central, T_{1/2}: demie vie d'élimination, Cl_{pl}: clairance plasmatique ; N.C. : Non Communiqué)

L'intérêt du calcul de ces paramètres en clinique était d'étudier leur modification au cours de périodes d'inhalation plus longues que celle pour lesquelles nous disposons de ces valeurs. Kharash *et al*³⁵ avait évalué les paramètres pharmacocinétiques d'une administration de sévoflurane lors de protocoles d'anesthésies de courtes durées. Les valeurs de demi-vie

(3,78 h) et de volume de distribution (42,4l) qu'il a retrouvées lors de ce travail sont proches de celles que nous avons déterminées dans notre étude (respectivement 2.8h et 53l). Ceci suggère que l'utilisation du sévoflurane sur le long terme rendue possible par l'utilisation du système AnaConDa n'a pas d'incidence sur le comportement pharmacocinétique de l'halogéné. Seule la valeur de la clairance plasmatique est bien plus importante dans notre étude que dans celle de Kharash *et al*³⁵ (156 l.h⁻¹ contre 32 l.h⁻¹). Ceci s'explique par le fait que kinetic pro estime la clairance plasmatique totale du produit (urinaire+pulmonaire) alors que Kharash *et al* estime la seule clairance rénale. Ceci démontre la part importante de l'élimination pulmonaire qui peut donc être estimée à 124 l.h⁻¹ (156-32 l.h⁻¹).

3.3.5. Tolérance rénale

Historiquement, les halogénés, en particulier le sévoflurane, ont été présentés comme ayant une certaine toxicité rénale. En effet, le métabolisme du sévoflurane entraîne la formation de métabolites potentiellement toxiques : Les ions fluorures et le compound A (voir paragraphe 2.2 de la partie bibliographique). Le compound A n'est pas formé lors de l'administration par le système AnaConDa dans la mesure où celui-ci apparaît lors du contact du sévoflurane avec la chaux sodée servant à absorber le dioxyde de carbone émis par le patient dans un circuit fermé classique.

Nous avons donc lors de notre protocole mesuré les taux de fluorures plasmatiques pendant les 48 heures de l'administration ainsi qu'évalué la fonction rénale par le dosage de l'urée et la créatinine plasmatique (**Figure 31** et **Figure 32**).

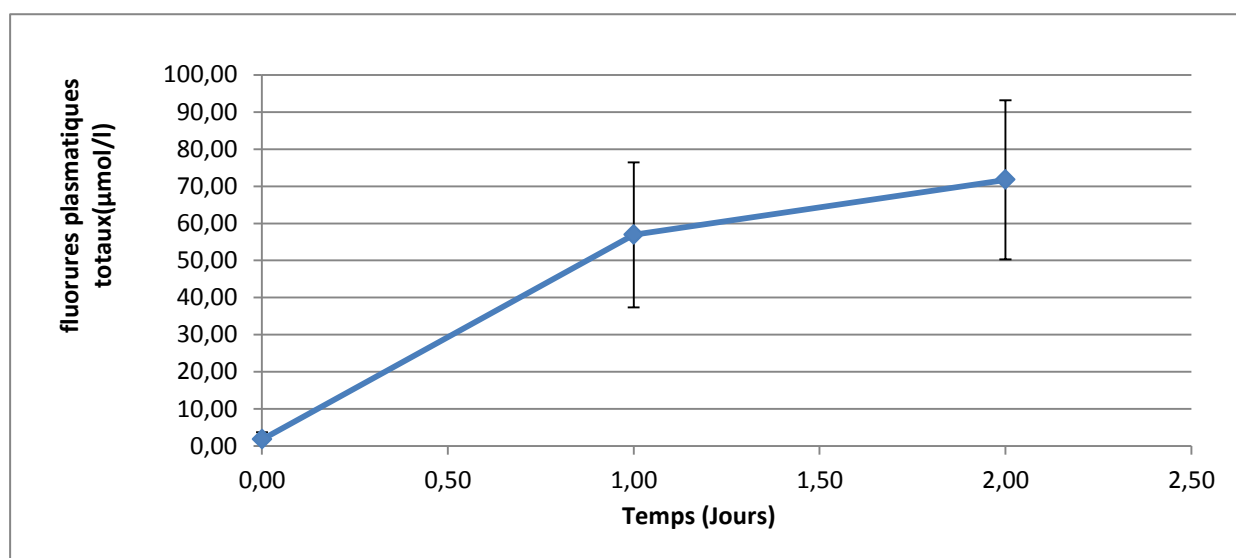


Figure 31 : Fluorures plasmatiques pendant la période d'inhalation

Les valeurs des fluorures relevées pendant le protocole atteignent donc un maximum de $71 \pm 21.5 \mu\text{mol/l}$ à 48 heures ce qui est bien supérieur aux valeurs déterminées comme toxiques rénales chez les patients traités par méthoxyflurane ^{42;43;44}. La **Figure 32** ne permet pas de mettre en évidence de toxicité rénale chez les patients. En effet les valeurs de créatininémie relevées à J0 ne sont pas significativement supérieures à celles relevées à J5 ($p=0.005$), J6 ($p=0.053$) et J7 ($p=0.035$). Les valeurs de l'urémie ne diffèrent pas avec J0 quel que soit le moment de prélèvement. Cette non-toxicité des ions fluorures malgré des concentrations importantes peut être corrélée avec le métabolisme hépatique du gaz. Les concentrations toxiques atteintes avec le méthoxyflurane devaient localement être bien supérieures au niveau rénal à celles mesurées au niveau plasmatique du fait de son métabolisme au niveau de cet organe (voir paragraphe 2.2.3 de la partie bibliographique).

Ceci est en faveur de l'utilisation du sévoflurane en sédation lors de protocoles de 48 heures grâce au système AnaConDa.

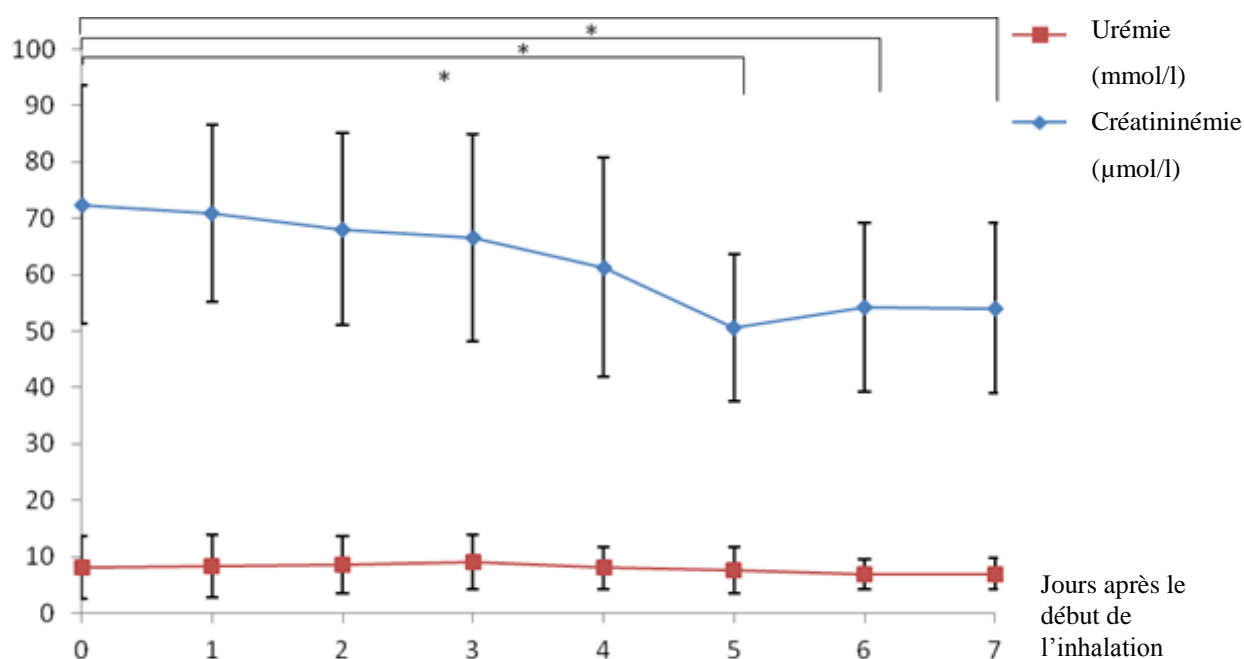


Figure 32 : évolution de l'urémie et la créatininémie après le début de l'inhalation (* : pas de différences significatives)

3.4. Conclusion sur l'essai clinique

Cette étude pilote a permis l'étude des propriétés pharmacocinétiques du sévoflurane et de son métabolite lors d'inhalation sur des périodes de 48 heures. Plus généralement, elle a permis l'évaluation et la mise en place d'un protocole d'étude du devenir du gaz chez certaines populations de patients. En effet, les patients de corpulence normale et de fonction rénale et

hépatique non-détériorées ne représentent qu'une faible part des patients hospitalisés en réanimation. Ainsi ce petit groupe de patients « normaux » servira de point de comparaison lors de l'application de ce protocole à d'autres types de patients (obèse, petit poids, insuffisants rénaux et/ou hépatiques) ouvrant ainsi la voie à l'utilisation du sévoflurane en sédation à une plus grande échelle.

Discussion générale et perspectives

1. Intérêt clinique de notre travail

En réanimation, avant l'apparition du dispositif AnaConDa, l'utilisation du sévoflurane était impossible du fait de l'absence de dispositif adapté pour l'administrer sur de longues périodes à faible concentration. En anesthésie, l'utilisation du sévoflurane ou d'autres halogénés est quasiment systématique en entretien grâce aux circuits d'anesthésie conventionnels. En effet, les caractéristiques pharmacocinétiques des halogénés sont reconnues depuis longtemps et mises à profit pour permettre une élimination rapide de l'agent anesthésique et donc un réveil également rapide du patient. Les sédations en réanimation étaient donc exclusivement réalisées grâce à des médicaments intraveineux (propofol ou midazolam par exemple) ce qui peut entraîner, sur de longues périodes une accumulation de l'hypnotique entraînant des syndromes de sevrage et des retards au réveil. Il a été démontré qu'à ces retards au réveil correspondait un séjour prolongé en réanimation ⁷⁹. Plusieurs auteurs ont cherché à limiter l'accumulation des médicaments intraveineux qui survient en cas de sédation prolongée : Saito *et al* a par exemple proposé une utilisation séquentielle du midazolam et du propofol, évitant ainsi l'accumulation de l'un ou de l'autre ⁸⁰. D'autres auteurs préconisent l'arrêt journalier de la sédation ^{79,81} dans la même optique pour éviter sur-sédation des patients.

En permettant l'utilisation du sévoflurane en réanimation, le filtre AnaConDa a ouvert la voie à de nouvelles pratiques utilisant ce gaz sur des durées et par des moyens différents de ceux pour lesquels il a été développé. Notre étude clinique, a montré la non accumulation du produit et sa rapide élimination en concordance avec l'étude de Mesnil *et al* ⁵⁷ qui montre la supériorité du sévoflurane en termes de rapidité de réveil post-extubation par rapport au propofol ou au midazolam. Ainsi, l'élimination rapide du sévoflurane démontrée sur de courts protocoles est conservée lors de longues durées de sédation. Ceci nous permet de positionner l'utilisation du sévoflurane avec l'AnaConDa comme une alternative intéressante aux protocoles intraveineux : la maniabilité de cette association permet un réveil plus rapide du patient ainsi que la possibilité de rapidement le sédater à nouveau sans risque d'accumulation de l'hypnotique ou de son métabolite principal.

De plus, le sévoflurane possède également des avantages qui lui valent une utilisation préférentielle dans certaines indications :

- Dans le traitement du bronchospasme réfractaire en réanimation : l'activité bronchodilatatrice du sévoflurane est mise à profit au moyen du filtre AnaConDa

- Lors de sédations insuffisantes malgré des doses importantes d'agents intraveineux : l'association sévoflurane/AnaConDa peut permettre un regain d'activité supplémentaire.

Cependant, l'utilisation du sévoflurane en réanimation grâce au système AnaConDa reste limitée et ce pour plusieurs raisons :

- Coût de l'investissement matériel qui s'ajoute à celui du gaz : Filtre, analyseur infrarouge.

- Impossibilité d'utiliser un dispositif à objectif de concentration comme pour les agents intraveineux : Le système AIVOC (Anesthésie Intra-Veineuse à Objectif de Concentration) procure un avantage certain quant à la simplicité d'utilisation des protocoles intraveineux que nous ne retrouvons pas pour le système AnaConDa. En effet, le praticien doit manuellement ajuster la vitesse du pousse-seringue pour obtenir la concentration souhaitée alors que grâce à l'AIVOC, l'ajustement de la dose se fait automatiquement et dynamiquement.

- Impossibilité d'utiliser le desflurane : Avec le plus faible coefficient de partage sang/gaz des 3 gaz commercialisés ⁴ (à 25°, isoflurane : 2.04, sévoflurane : 1.1 et desflurane : 0.75) le desflurane possède la cinétique la plus rapide. Ces propriétés ne sont pas exploitables avec le système AnaConDa, ce gaz n'étant pas retenu sur le filtre.

Enfin, nous avons démontré l'absence de détérioration fonctionnelle lors du protocole grâce à l'évaluation de la créatininémie et de l'urémie. Au moment de la mise en place de cet essai clinique, l'utilisation du dosage de la protéine NGAL en tant que marqueur précoce de toxicité rénale n'était pas développée. Or il semble aujourd'hui que cette analyse soit la plus pertinente pour cette évaluation^{82,83}. Il sera intéressant d'intégrer cela dans les futures études.

2. Perspectives

Notre travail a permis la mise en place et la validation d'une technique analytique nous permettant d'évaluer la pharmacocinétique du sévoflurane et de ses métabolites principaux (HFIP et fluorures). Nous l'avons appliquée à l'évaluation chez les patients de corpulence normale et sans défaillance rénale ou hépatique. Le métabolisme du sévoflurane étant hépatique, l'élimination du HFIP rénale^{33,34}, et la toxicité principale rénale, il nous paraît important d'appliquer notre méthodologie aux patients insuffisants rénaux et hépatiques très représentés en réanimation.

Actuellement, nous réalisons un essai clinique portant sur l'utilisation du protocole avec l'obésité comme critère d'inclusion pour les patients. Les données obtenues pourront être

comparées à celle obtenus chez les patients de corpulence normale pour déterminer l'influence de ce paramètre.

Le protocole de l'étude des patients insuffisant rénaux est également en cours de rédaction en vue de sa présentation devant le Comité de Protection des Personnes (CPP Sud-Est VI) et son application lors d'un nouvel essai clinique. Le dosage de la protéine NGAL sera utilisé pour l'évaluation de la toxicité rénale.

Par ailleurs, il existe en développement un nouveau filtre, commercialisé par une société concurrente de celle commercialisant le système AnaConDa, permettant d'une part l'utilisation du desflurane alliée à un dispositif à objectif de concentration. Ainsi la cinétique très rapide de ce gaz ainsi que la possibilité de réaliser des sédations avec un dispositif comparable au système AIVOC nous paraît constituer un concurrent très intéressant à l'association AnaConDa/sévoflurane. Nous nous proposons donc d'adapter notre technique d'analyse et notre méthodologie à la quantification du desflurane afin d'évaluer la pharmacocinétique et la tolérance de ce gaz administré par ce nouveau dispositif médical et de participer à son évaluation clinique.

Conclusion

Le sévoflurane est aujourd'hui surtout utilisé en anesthésie. L'utilisation en réanimation est plus anecdotique du fait de la suprématie des protocoles intraveineux, qui occupent le terrain depuis des décennies et dispose d'un recul d'utilisation très important. Néanmoins, comme nous l'avons vu, le sévoflurane a démontré de réels avantages, tant en terme de maniabilité qu'en qualité de sédation et sécurité pour le patient. L'utilisation du sévoflurane, *a fortiori* avec le dispositif AnaConDa s'est donc petit à petit imposé comme une alternative intéressante aux médicaments intraveineux en réanimation. Cependant, les études ayant abouties au marquage CE du dispositif médical, réalisées avant la commercialisation du sévoflurane, n'avaient pas évalué l'utilisation du sévoflurane avec ce filtre durant de longues périodes.

Grâce à la technique d'analyse et le protocole d'étude développés et validés, nous avons pu montrer la non accumulation du sévoflurane et du HFIP lors de tels protocoles ainsi que l'absence de modification des paramètres rénaux des patients inclus. Les paramètres pharmacocinétiques ne semblent pas non plus être modifiés par rapport aux données bibliographiques disponibles par l'augmentation de durée d'inhalation et l'utilisation du filtre AnaConDa.

Notre travail pose donc les bases de travaux supplémentaires portant sur les différentes catégories de patients rencontrés en réanimation tels que les patients obèses ou de faible poids ainsi que les patients souffrant d'insuffisance rénale ou hépatique.

Soucieux de développer l'utilisation de cette alternative intéressante aux protocoles de sédation intraveineux, un nouvel essai clinique a été mis en place par notre équipe au CHU de Clermont-Ferrand afin d'étudier cette fois-ci l'influence de l'obésité sur la pharmacocinétique du sévoflurane en sédation par le système AnaConDa. Le protocole d'évaluation introduit avec ce travail pourra donc être aisément appliqué à cette nouvelle population de patients ainsi que sur les patients souffrant d'une insuffisance rénale.

Références bibliographiques

1. Riegels N, Richards *Humphry davy: his life, works, and contribution to anesthesiology*. MJ. Anesthesiology. 2011 Jun;114(6):1282-8.
2. Holaday DA, Smith FR. *Clinical characteristics and biotransformation of sévoflurane in healthy human volunteers*. Anesthesiology. 1981 Feb;54(2):100-6.
3. Aboul-Enein HY, Bojarski J, Szymura-Oleksiak J. *The impact of chirality of the fluorinated volatile inhalation anaesthetics on their clinical applications*. Biomed. Chromatogr. 2000;14(4):213-218.
4. Yang NC, Wang HF, Hwang KL, Ho WM. *A novel method for determining the blood/gas partition coefficients of inhalation anesthetics to calculate the percentage of loss at different temperatures* J Anal Toxicol. 2004 Mar;28(2):122-7.
5. Wallin RF, Regan BM, Napoli MD, Stern IJ. *Sévoflurane: a new inhalational anesthetic agent*. Anesth Analg. 1975 Nov-Dec;54(6):758-66.
6. Strum DP, Eger EI 2nd *Partition coefficients for sévoflurane in human blood, saline, and olive oil*. Anesth Analg. 1987 Jul;66(7):654-6.
7. Allott PR, Steward A, Flook V, Mapleson WW. *variation with temperature of the solubilities of inhaled anaesthetics in water, oil and biological media*. Br J Anaesth. 1973;45(3):294-300.
8. Meiser A, Bellgardt M, Belda J, Rohm K, Laubenthal H, Sirtl C. *Technical performance and reflection capacity of the anaesthetic conserving device--a bench study with isoflurane and sévoflurane*. J Clin Monit Comput. 2009 Feb;23(1):11-9.
9. Odin A, Nathan N. *Anesthésiques halogénés*. EMC (Elsevier Masson SAS), Anesthésie-Réanimation, 36-285-A-10, 2005.

10. Alkire MT, Haier RJ, Fallon JH. *Toward a unified theory of narcosis: brain imaging evidence for a thalamocortical switch as the neurophysiologic basis of anesthetic-induced unconsciousness.* Conscious Cogn 2000;9:370-86.
11. Jones MV, Harrison NL. *Effects of volatile anesthetics on the kinetics of inhibitory postsynaptic currents in cultured rat hippocampal neurons.* J Neurophysiol 1993;70:1339-49.
12. Larsen M, Grondahl TO, Haugstad TS, Langmoen IA. *The effect of the volatile anesthetic isoflurane on Ca(2+) -dependent glutamate release from rat cerebral cortex.* Brain Res 1994;663:335-7.
13. Eilers H, Kindler CH, Bickler PE. *Different effects of volatile anesthetics and polyhalogenated alkanes on depolarization-evoked glutamate release in rat cortical brain slices.* Anesth Analg 1999;88.
14. Antkowiak B. *Different actions of general anesthetics on the firing patterns of neocortical neurons mediated by the GABA(A) receptor.* Anesthesiology 1999;91:500-11.
15. Zhang Y, Eger EI 2nd, Dutton RC, Sonner JM. *Inhaled anesthetics have hyperalgesic effects at 0.1 minimum alveolar anesthetic concentration.* Anesth Analg. 2000 Aug;91(2):462-6.
16. Nishiyama T, Sugai N, Hanaoka K. *Cerebrovascular CO2 reactivity in elderly and younger adult patients during sévoflurane anaesthesia.* Can J Anaesth. 1997;44(2):160-164.
17. KurodaY, Murakami M, Tsuruta J, Murakawa T, Sakabe T. *Blood flow velocity of middle cerebral artery during prolonged anesthesia with halothane, isoflurane, and sévoflurane in humans.* Anesthesiology 1997; 87:527-32.

18. Todd MM, Warner DS, Sokoll MD, Maktabi MA, Hindman BJ, Scamman FL, et al. *A prospective, comparative trial of three anesthetics for elective supratentorial craniotomy. Propofol/fentanyl, isoflurane /nitrous oxide, and fentanyl/nitrous oxide.* Anesthesiology 1993;78:1005-20.
19. Lenz C, Frietsch T, Futterer C, Rebel A, Van Ackern K, Kuschinsky W, et al. *Local coupling of cerebral blood flow to cerebral glucose metabolism during inhalational anesthesia in rats: desflurane versus isoflurane.* Anesthesiology 1999;91:1720-3.
20. Mielck F, Stephan H, Buhre W, Weyland A, Sonntag H. *Effects of 1 MAC desflurane on cerebral metabolism, blood flow and carbon dioxide reactivity in humans.* Br J Anaesth 1998;81:155-60.
21. Rampil IJ, King BS. *Volatile anesthetics depress spinal motor neurons.* Anesthesiology 1996;85:129-34.
22. Muellejans B, Matthey T, Scholpp J, Schill M. *Sedation in the intensive care unit with remifentanyl/propofol versus midazolam/fentanyl: a randomised, open-label, pharmacoeconomic trial.* Crit Care. 2006;10(3):R91. Epub 2006 Jun 15.
23. Eroglu A, Celep F, Erciyes N. *A Comparison of Sister Chromatid Exchanges in Lymphocytes of Anesthesiologists to Nonanesthesiologists in the Same Hospital.* Anesthesia & Analgesia. 2006;102(5):1573-1577.
24. Wiesner G, Schiewe-Langgartner F, Lindner R, Gruber M. *Increased formation of sister chromatid exchanges, but not of micronuclei, in anaesthetists exposed to low levels of sévoflurane.* Anaesthesia. 2008;63(8):861-864.
25. De Jonghe B, Cook D, Appere-De-Vecchi C, Guyatt G, Meade M, Outin H. *Using and understanding sedation scoring systems: a systematic .* Intensive Care Med. 2000 Mar;26(3):275-85.

26. Ely EW. *Monitoring Sedation Status Over Time in ICU Patients: Reliability and Validity of the Richmond Agitation-Sedation Scale (RASS)*. JAMA. 2003;289(22):2983-2991.
27. Chanques G, Jaber S, Barbotte E, Verdier R, Henriette K, Lefrant JY, Eledjam JJ : *Validation of the french translated Richmond vigilance-agitation scale*. Ann Fr Anesth Reanim 2006 ; 25 : 696-701
28. Sakai EM, Connolly LA, Klauck JA. *Inhalation Anesthesiology and Volatile Liquid Anesthetics: Focus on Isoflurane, Desflurane, and Sévoflurane*. Pharmacotherapy. 2005;25(12):1773-1788.
29. Stureson LW, Johansson A, Bodelsson M, Malmkvist G. *Wash-in kinetics for sévoflurane using a disposable delivery system (AnaConDa) in cardiac surgery patients*. Br J Anaesth. 2009 Apr;102(4):470-6
30. Nakamura M, Sanjo Y, Ikeda K.: *Predicted sévoflurane partial pressure in the brain with an uptake and distribution model comparison with the measured value in internal jugular vein blood*. J Clin Monit Comput. 1999 Jul; 15(5):299-305.
31. Lu CC, Tsai CS, Ho ST, Chen WY, Wong CS, Wang JJ, Hu OY, Lin CY.: *Pharmacokinetics of sévoflurane uptake into the brain and body*. Anaesthesia. 2003 Oct; 58(10):951-6.
32. Turner MJ, McCulloch TJ, Kennedy RR, Baker AB. *Pharmacokinetics of sévoflurane uptake into the brain*. Anaesthesia. 2004;59(12):1201-1206.
33. Kharasch ED: *Biotransformation of sévoflurane*. Anesth Analg 1995; 81: S27-38
34. Kharasch ED, Thummel KE. *Identification of cytochrome P450 2E1 as the predominant enzyme catalyzing human liver microsomal defluorination of sévoflurane, isoflurane, and methoxyflurane*. Anesthesiology 1993;79:795-807.

35. Kharasch ED, Karol MD, Lanni C, Sawchuk R.: *Clinical sévoflurane metabolism and disposition. I. Sévoflurane and metabolite pharmacokinetics*. Anesthesiology. 1995 Jun;82(6):1369-78.
36. Kharasch ED, Armstrong AS, Gunn K, Artru A, Cox K, Karol MD *Clinical sévoflurane metabolism and disposition. II. The role of cytochrome P450 2E1 in fluoride and hexafluoroisopropanol formation*. Anesthesiology. 1995 Jun;82(6):1379-88.
37. Burrows DL, Nicolaides A, Stephens GC, Ferslew KE. *The distribution of sevoflurane in a sevoflurane induced death*. J. Forensic Sci. 2004 mars;49(2):394–7.
38. Rosales CM, Young T, Laster MJ, Eger EI, Garg U. *Sevoflurane Concentrations in Blood, Brain, and Lung After Sevoflurane-Induced Death*. J Forensic Sci. 2007 Nov;52(6):1408-10.
39. Kharasch, Evan D. M.D., Ph.D.*; Jubert, Carole Ph.D *Compound A Uptake and Metabolism to Mercapturic Acids and 3,3,3-Trifluoro-2-fluoromethoxypropanoic Acid during Low-flow Sévoflurane Anesthesia: Biomarkers for Exposure, Risk Assessment, and Interspecies Comparison* Anesthesiology. 1999 Nov;91(5):1267-78.
40. Cunningham DD, Webster J, Nelson D, Williamson B.: *Analysis of sévoflurane degradation products in vapor phase samples*. J Chromatogr B Biomed Appl. 1995 Jun 9;668(1):41-52.
41. Gonsowski CT, Laster MJ, Eger EI, Ferrell LD, Kerschmann RL. *Toxicity of compound A in rats. Effect of increasing duration of administration*. Anesthesiology 1994;80:566-73.
42. Mazze RI, Cousins MJ. *Biotransformation of methoxyflurane*. Int Anesthesiol Clin. 1974 Summer;12(2):93-105.
43. Cousins MJ, Mazze RI *Methoxyflurane nephrotoxicity. A study of dose response in man*. JAMA. 1973 Sep 24;225(13):1611-6.

44. Mazze RI, Cousins MJ *The effect of methoxyflurane anaesthesia and surgery on postoperative renal function in man* .Anaesthesist. 1973 Apr;22(4):171.
45. Higuchi H, Sumikura H, Sumita S, Arimura S, Takamatsu F, Kanno M, Satoh T.*Renal function in patients with high serum fluoride concentrations after prolonged sévoflurane anesthesia*. Anesthesiology. 1995 Sep;83(3):449-58.
46. Obata R, Bito H, Ohmura M, Moriwaki G, Ikeuchi Y, Katoh T, Sato S.*The effects of prolonged low-flow sevoflurane anesthesia on renal and hepatic function*. Anesth Analg. 2000 Nov;91(5):1262-8.
47. Tsukamoto N, Hirabayashi Y, Shimizu R, Mitsuhata H. *The effects of sévoflurane and isoflurane anesthesia on renal tubular function in patients with moderately impaired renal function*. Anesth Analg. 1996 May;82(5):909-13.
48. Kharasch ED, Hankins DC, Thummel KE. *Human kidney methoxyflurane and sévoflurane metabolism. Intrarenal fluoride production as a possible mechanism of methoxyflurane nephrotoxicity*. Anesthesiology 1995;82: 689-99.
49. Belda JF, Soro M, Badenes R, Meiser A, Garcia ML, Aguilar G, *et al*. *The predictive performance of a pharmacokinetic model for manually adjusted infusion of liquid sevofluorane for use with the Anesthetic-Conserving Device (AnaConDa): a clinical study*. Anesth Analg. 2008 Apr;106(4):1207-14.
50. Stanik-Hutt JA, Soeken KL, Belcher AE, Fontaine DK, Gift AG. *Pain experiences of traumatically injured patients in a critical care setting*.Am J Crit **Care**. 2001 Jul;10(4):252-9.
51. Tempia A, Olivei MC, Calza E, Lambert H, Scotti L, Orlando E, Livigni S, Guglielmotti E. *The anesthetic conserving device compared with conventional circle system used under different flow conditions for inhaled anesthesia*.Anesth Analg. 2003 Apr;96(4):1056-61.

52. Meiser A, Sirtl C, Bellgardt M, Lohmann S, Garthoff A, Kaiser J, Hugler P, Laubenthal H. *Desflurane compared with propofol for postoperative sedation in the intensive care unit*. British Journal of Anaesthesia. 2003;90(3):273-280.
53. Meiser A, Laubenthal H. *Inhalational anaesthetics in the ICU: theory and practice of inhalational sedation in the ICU, economics, risk-benefit*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol. 2005 Sep;19(3):523-38. Review.
54. Sackey PV, Martling CR, Radell PJ. *Three cases of PICU sedation with isoflurane delivered by the 'AnaConDa'*. Paediatr Anaesth. 2005 Oct;15(10):879-85.
55. Sackey PV, Martling CR, Granath F, Radell PJ. *Prolonged isoflurane sedation of intensive care unit patients with the Anesthetic Conserving Device*. Crit Care Med. 2004 Nov;32(11):2241-6.
56. Enlund M, Kietzmann D, Bouillon T, Züchner K, Meineke I. *Population pharmacokinetics of sevoflurane in conjunction with the AnaConDa : toward target-controlled infusion of volatiles into the breathing system*. Acta Anaesthesiologica Scandinavica. 2008;52(4):553-560.
57. Mesnil M, Capdevila X, Bringuier S, et al. *Long-term sedation in intensive care unit: a randomized comparison between inhaled sevoflurane and intravenous propofol or midazolam*. Intensive Care Medicine. 2011;37:933-941.
58. Pihlainen K, Ojanperä I. *Analytical toxicology of fluorinated inhalation anaesthetics*. Forensic Science International. 1998;97(2-3):117-133.
59. L'her E, Dy L, Pili R, Prat G, Tonnelier JM, Lefevre M, Renault A, Boles JM. *Feasibility and potential cost/benefit of routine isoflurane sedation using an anesthetic-conserving device: a prospective observational study*. Respir Care. 2008 Oct;53(10):1295-303.

60. Bergadano A, Lauber R, Zbinden A, Schatzmann U, Moens Y. : *Blood/gas partition coefficients of halothane, isoflurane and sévoflurane in horse blood*. Br J Anaesth. 2003 Aug; 91(2):276-8.
61. Morgan SE, Frink EJ, Gandolfi AJ : *A simplified gas chromatographic method for quantifying the sévoflurane metabolite hexafluoroisopropanol*. Anesthesiology. 1994 Jan;80(1):201-5.
62. Yang NC, Hwang KL, Shen CH, Wang HF, Ho WM.: *Simultaneous determination of fluorinated inhalation anesthetics in blood by gas chromatography-mass spectrometry combined with a headspace autosampler*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2001 Aug 15;759(2):307-18.
63. Accorsi A, Barbieri A, Raffi GB, Violante FS. : *Biomonitoring of exposure to nitrous oxide, sévoflurane, isoflurane and halothane by automated GC/MS headspace analysis* Int Arch Occup Environ Health. 2001 Oct;74(8):541-8.
64. Accorsi A, Morrone B, Benzo M, Gandini C, Raffi GB, Violante FS *Simultaneous determination of unmodified sévoflurane and of its metabolite hexafluoroisopropanol in urine by headspace sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry*.J Chromatogr A. 2005 Apr 15;1071(1-2):131-4.
65. Huang CC. :*Carbondisulfide neurotoxicity: Taiwan experience*.Acta Neurol Taiwan. 2004 Mar;13(1):3-9
66. Sills RC, Harry GJ, Valentine WM, Morgan DL. : *Interdisciplinary neurotoxicity inhalation studies: Carbon disulfide and carbonyl sulfide research in F344 rats*.Toxicol Appl Pharmacol. 2005 Sep 1;207(2 Suppl):245-50.
67. Wang ZP, Xie KQ, Li HQ.:*Effect of carbon disulfide exposure at different phases on the embryonic development in mid-pregnancy of female mice* Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi. 2005 Apr;23(2):139-4.

68. Morvai V, Szakmary E, Ungvary G. :*The effects of carbon disulfide and ethanol on the circulatory system of rats.**J Toxicol Environ Health A.* 2005 May 28;68(10):797-809.
69. Vermeulen R, Jonsson BA, Lindh CH, Kromhout H.: *Biological monitoring of carbon disulphide and phthalate exposure in the contemporary rubber industry.* *Int Arch Occup Environ Health.* 2005 Sep;78(8):663-9. Epub 2005 Oct 12.
70. Iliadis A, Brown AC, Huggins ML. *APIS: a software for model identification, simulation and dosage regimen calculations in clinical and experimental pharmacokinetics.* *Comput Methods Programs Biomed.* 1992 août;38(4):227–39.
71. Petricoul O, Claret L, Barbolosi D, Iliadis A, Puozzo C. *Information tools for exploratory data analysis in population pharmacokinetics.* *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2001 déc;28(6):577–99.
72. Payen JF, Bru O, Bosson JL, Lagrasta A, Novel E, Deschaux I, Lavagne P, Jacquot C.*Assessing pain in critically ill sedated patients by using a behavioral pain scale.* *Crit Care Med* 2001; 29:2258-63.
73. Berton J, Sargentini C, Nguyen JL, Belii A, Beydon L. *AnaConDa reflection filter: bench and patient evaluation of safety and volatile anesthetic conservation.* *Anesth Analg* 2007; 104:130-4.
74. Walter SD, Eliasziw M, Donner A. *Sample size and optimal designs for reliability studies.* *Stat Med.* 1998 janv 15;17(1):101–10.
75. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A. *Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury.* *Crit Care* 2007; 11:R31.

76. Soro M, Badenes R, Garcia-Perez ML, et al. *The Accuracy of the Anesthetic Conserving Device (Anaconda©) as an Alternative to the Classical Vaporizer in Anesthesia.* *Anesthesia & Analgesia.* 2010;111(5):1176-1179.
77. Wissing H, Kuhn I, Rietbrock S, Fuhr U. *Pharmacokinetics of inhaled anaesthetics in a clinical setting: comparison of desflurane, isoflurane and sevoflurane.* *Br J Anaesth.* 2000 Apr;84(4):443-9.
78. Rietbrock S, Wissing H, Kuhn I, Fuhr U. *Pharmacokinetics of inhaled anaesthetics in a clinical setting: description of a novel method based on routine monitoring data.* *Br J Anaesth.* 2000 Apr;84(4):437-42.
79. Kress JP, Vinayak AG, Levitt J, Schweickert WD, Gehlbach BK, Zimmerman F, et al. *Daily sedative interruption in mechanically ventilated patients at risk for coronary artery disease.* *Crit. Care Med.* 2007 févr;35(2):365-71.
80. Saito M, Terao Y, Fukusaki M, Makita T, Shibata O, Sumikawa K. *Sequential use of midazolam and propofol for long-term sedation in postoperative mechanically ventilated patients.* *Anesth. Analg.* 2003 mars;96(3):834-838, table of contents.
81. Kress JP, Pohlman AS, O'Connor MF, Hall JB. *Daily interruption of sedative infusions in critically ill patients undergoing mechanical ventilation.* *N Engl J Med.* 2000 May 18;342(20):1471-7.
82. Bagshaw SM, Bennett M, Haase M, Haase-Fielitz A, Egi M, Morimatsu H, et al. *Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in septic versus non-septic acute kidney injury in critical illness.* *Intensive Care Medicine.* 2009 déc 3;36(3):452-61.
83. Bouman CSC, Forni LG, Joannidis M. *Biomarkers and acute kidney injury: dining with the Fisher King?* *Intensive Care Medicine.* 2009 déc 3;36(3):381-4.

Communications sur le sujet

Notre étude a fait l'objet des communications affichées suivantes :

- **Bourdeaux D**, Perbet S, Sautou V, Constantin JM, , Bazin JE, Chopineau J *Le sévoflurane en sédation au moyen de l'Anesthetic Conserving Device (AnaConDa): une alternative intéressante à la sédation par voie intraveineuse*. Poster sélectionné pour une communication affichée. Congrès SFPC Bordeaux 2012.
- **Bourdeaux D**, Sautou V, Montagner A, Perbet S, Constantin JM, Bazin JE, Chopineau J *simple method for determination of plasma sevoflurane and its metabolite hexafluoroisopropanol by headspace gc-ms* Poster sélectionné pour une communication affichée. Congrès ASHP Chicago 2009.
- **Bourdeaux D**, Montagner A, Perbet S, Sautou V, Constantin JM, Bazin JE, Chopineau J *suivi des concentrations en sévoflurane et en hexafluoroisopropanol lors de sédations par sevoflurane au moyen de l'anesthetic conserving device* Congrès annuel APHO Rennes 2008.
- **Bourdeaux D**, Perbet S, Montagner A, Constantin JM, Sautou V, Chopineau J, Bazin JE *cinétique des ions fluorures au cours de la sédation par sevoflurane en Réanimation* Poster sélectionné pour une communication affichée avec communication orale SFAR Paris 2008.
- Ponrouch M, **Bourdeaux D**, Montagner A, Constantin JM, Sautou V, Cayot-Constantin S, Chopineau J, Bazin JE. *administration prolongée de sevoflurane en réanimation: étude pharmacocinétique* Poster sélectionné pour une communication affichée avec communication orale Congrès SFAR Paris 2007.

Publications internationales

Article 1

*Simple assay of plasma sevoflurane and its
metabolite hexafluoroisopropanol by headspace
GC–MS*

Bourdeaux D, Sautou-Miranda V, Montagner A, Perbet S, Constantin JM, Bazin J-E, Chopineau J. Journal of Chromatography B. 2010 janv;878(1):45–50.



Simple assay of plasma sevoflurane and its metabolite hexafluoroisopropanol by headspace GC–MS

Daniel Bourdeaux^{a,b,*}, Valérie Sautou-Miranda^{a,b}, Agnès Montagner^a, Sébastien Perbet^c, Jean Michel Constantin^c, Jean-Etienne Bazin^c, Jean Chopineau^{a,b}

^a CHU Clermont-Ferrand, Department of Pharmacy, Hôpital G Montpied, F-63003 Clermont-Ferrand, France

^b Univ. Clermont 1, Faculty of Pharmacy, Laboratory of Clinical Pharmacy and Biotechnics, 28 Place Henri Dunant, F-63001 Clermont-Ferrand, France

^c CHU Clermont-Ferrand, Surgical Intensive Care Unit, Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Hôtel-Dieu, F-63000 Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 March 2009

Accepted 11 November 2009

Available online 28 November 2009

Keywords:

Sevoflurane

HFIP

Headspace gas chromatography

Mass spectrometry

Pharmacokinetic study

Anesthetic conserving device

ABSTRACT

The anesthetic sevoflurane can now be delivered over periods of up to 48 h using a newly developed medical system, the AnaConDa (anesthetic conserving device). Lack of pharmacokinetic data on sevoflurane and its main metabolite (hexafluoroisopropanol, HFIP) in this indication prompted us to develop a headspace GC–MS method to quantify the two substances. The only previously published method for assaying the two substances could not be adapted to our study since it uses expensive and rarely employed system components together with toxic carbon disulfide as a dilution solvent. The method developed is straightforward and uses the relatively non-toxic solvent undecane as dilution solvent and chloroform as internal standard. The method is linear for a concentration range of 1–150 µg/ml, and presents high accuracy and precision. LOD and LOQ are 0.2 and 1 µg/ml, with a short analysis time (7.6 min for a single analysis). The method was applied to determine the plasma levels of sevoflurane and HFIP in six patients under 48-h anesthetic sedation delivered via the AnaConDa system. Average sevoflurane and HFIP concentrations plateaued at 75 and 4 µg/ml, respectively. Sevoflurane quickly tailed off after inhalation was stopped, and HFIP levels remained low.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sevoflurane is a halogenated inhalational anesthetic widely used in anesthesiology due to its rapid offset and cardioprotective effects [1]. The use of halogenated agents has rarely been explored as an anesthetic strategy for ICU patients due to technical difficulties with administration. A new medical delivery system, the anesthetic conserving device (or AnaConDa for short), which evaporates and conserves the halogenated vapor in a respiratory filter opens up perspectives for using halogenated agents for ICU patient sedation over periods of several days [2–4]. The time-course patterns of the plasma concentrations of sevoflurane and its main metabolite hexafluoroisopropanol (HFIP) [5] have been determined for anesthetic sedation only over periods of a few hours [6–8]. The pharmacokinetic profile of sevoflurane for sedation periods up to 48 h also remains unknown. The few validated chromatographic assay techniques capable of simultaneously determining sevoflurane and HFIP concentrations are often highly sophisticated and ill-suited to pharmacokinetic studies [9]. This study was designed

to develop a simple, rapid technique, coupling headspace gas chromatography and mass spectrometry for the reliable assay of a broad range of sevoflurane and free HFIP concentrations. This broad range-span was designed to make it possible to run pharmacokinetic studies and at the same time highlight any drug accumulation in the blood.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Undecane (dilution solvent), HFIP and chloroform (internal standard) were purchased from Fluka chemicals (USA). Sevoflurane was provided by Abbott Labs (Sevorane®). All analytes and their solvents were kept stored at 4 °C to minimize risk of evaporation when later used.

2.2. Preparation of the calibration standard

Standard plasma solutions were prepared by taking 1 ml of blank plasma (E.F.S. Clermont-Ferrand, France) and adding 20 µl of aqueous solution containing HFIP and 20 µl of solution in undecane containing sevoflurane and chloroform (internal stan-

* Corresponding author at: CHU Clermont-Ferrand, Department of Pharmacy, Hôpital G Montpied, F-63003 Clermont-Ferrand, France.

E-mail address: dbourdeaux@chu-clermontferrand.fr (D. Bourdeaux).

an internal calibration method based on chloroform as calibration standard. The plasma concentration–time curves were plotted using Excel (Microsoft, USA).

2.6. Sampling technique and matrix selection

Preliminary trials conducted before the study showed that assay repeatability was better on plasma than on total blood. However, as demonstrated by Yang et al. [10], sample handling during centrifugation, combined with residual air in the sampling tubes, is liable to cause analyte losses. We assessed analyte loss by comparing blood samples taken with gas-tight syringes (without residual air) with samples taken in vacuum tubes (with approximately 0.5 ml of residual air for 5 ml of liquid blood). The samples were taken from the venous catheter fitted in the first patient included in the clinical study, using the protocol below. Three samples were collected for each condition.

- 1 ml of whole blood was sampled in a gas-tight syringe (air-free) and the sample was transferred to a headspace tube containing 20 μ l of internal standard solution and hermetically sealed.
- 1 ml of whole blood was sampled in a vacuum tube and the sample was transferred to a headspace tube containing 20 μ l of internal standard solution and hermetically sealed.
- 1 ml of plasma obtained by centrifugation of whole blood was sampled in a gas-tight syringe and the sample was transferred to a headspace tube containing 20 μ l of internal standard solution and hermetically sealed. The syringe was placed directly inside the centrifuge without transferring the contents into a tube, thus avoiding exposure to air. Then 1 ml of plasma was transferred rapidly to the headspace tube.
- 1 ml of plasma obtained by centrifugation of whole blood was sampled in a vacuum tube and the sample was transferred into a headspace tube containing 20 μ l of internal standard solution and hermetically sealed.

2.7. Validation

2.7.1. Calibration curve and linearity

Plasma concentrations of sevoflurane used as an anesthetic [6–8] can reach 150 μ g/ml for a level of sevoflurane in exhaled air of 2.5%. The sevoflurane level in exhaled air studied under sedation was 1.5%, which makes it reasonable to assume that a calibration standard can be set with an upper bound of 150 μ g/ml. The calibration curve was therefore plotted from five calibration standard points (1, 5, 20, 50 and 150 μ g/ml of sevoflurane and HFIP, 12 μ g/ml of chloroform as internal standard). Linearity was estimated by the coefficient of determination calculated from the average calibration curve ($n=5$).

2.7.2. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ)

The LOD (concentration giving a signal-to-noise ratio of less than 3) and LOQ (defined as the lowest concentration at which the quantification obtained with precision and repeatability at a factor of less than 20%) were determined.

2.7.3. Precision and accuracy

The precision of the assay method was assessed by repeatability and reproducibility over three concentrations (1, 5 and 150 μ g/ml). The coefficients of variation were calculated based on quintuplicate runs for each concentration, analyzed on the same day for repeatability and on different days for reproducibility. Standard deviation from the set-point value was determined for each concentration.

2.7.4. Sample stability

Sample stability in response to freezing was determined on plasma samples at concentrations 1, 5 and 150 μ g/ml. At each concentration, assays were run on five samples immediately after preparation (benchmark concentration) and then on five samples 15 days after freezing at -20°C . A sample was considered stable if its average sevoflurane and HFIP concentrations measured after freezing varied by no more than 10% from the benchmark concentration and if there was no evidence of degradation.

2.8. Application

The method was used to assay plasma sevoflurane and HFIP in six ICU patients presenting no kidney or liver damage and who needed 48-h-plus sedation. The experiment was approved by the local Research Ethics Committee. The patients were placed under sedation for 48 h. A total of 13 samples per patient were taken during sedation and then for 6 h after the anesthetic was withdrawn. We recorded the time-course patterns of plasma sevoflurane and HFIP concentrations.

3. Results

3.1. Experimental plan

Fig. 1 shows the example of the cumulated Pareto diagram on the resolution between sevoflurane and chloroform peaks (R_1). Each bar of the diagram expresses the percentage variation of the R_1 response due to each variable. The percentages are ranked from the highest to the lowest and are cumulated. In this example, we can see that X_5 (GC oven temperature 1), X_4 (HS injection time), and X_2 (HS thermostating time) explain 95% of the variation of R_1 values in the experimental design. Table 3 recapitulates all the Pareto diagrams for the four responses.

This study enabled us to choose the best compromise values for the seven variables to optimize the four responses chosen. This gives the GC and HS variables described below.

3.1.1. Headspace variables

The oven, needle and transfer line temperatures were 95, 110 and 180°C , respectively. Thermostating time, pressurization time and needle injection time were 20, 3, and 0.03 min, respectively.

3.1.2. Chromatographic variables

The temperature program started with the oven at 60°C for 1.5 min. The temperature was then ramped up at a rate of $45^{\circ}\text{C}/\text{min}$

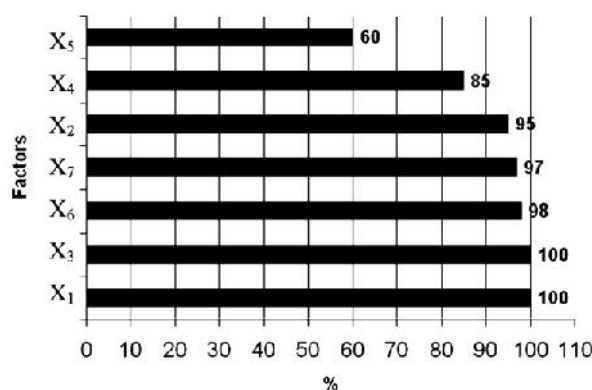


Fig. 1. Example of the Pareto diagram for the R_1 response (sevoflurane and chloroform peak resolution). X_1 : HS thermostating temperature. X_2 : HS thermostating time. X_3 : HS pressurization time. X_4 : HS injection time. X_5 : GC temperature 1. X_6 : GC temperature ramp 1. X_7 : GC temperature 2.

Table 1
Hadamard matrix, seven factors, eight experiments.

Experiments	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7
1	1	1	1	–1	1	–1	–1
2	–1	1	1	1	–1	1	–1
3	–1	–1	1	1	1	–1	1
4	1	–1	–1	1	1	1	–1
5	–1	1	–1	–1	1	1	1
6	1	–1	1	–1	–1	1	1
7	1	1	–1	1	–1	–1	1
8	–1	–1	–1	–1	–1	–1	–1

X_n : factors of the experimental design.

dard). These aqueous and undecane solution was concentrated at 50, 250, 1000, 2500 and 7500 $\mu\text{g/ml}$ of sevoflurane and HFIP and 600 $\mu\text{g/ml}$ of chloroform to prepare the five calibration standard points (1, 5, 20, 50 and 150 $\mu\text{g/ml}$ of sevoflurane and HFIP, 12 $\mu\text{g/ml}$ of chloroform as internal standard). The plasma solutions obtained were stored in 20 ml glass headspace tubes (Antélia Lyon, France) screwed hermetically tight with a Teflon-sealed cap. These standards solutions were used to carry out the validation process.

2.3. Equipment setup

The sample to be assayed was introduced into a HS40 headspace system (PerkinElmer, USA) coupled to a gas chromatograph in tandem with a Clarus 500 mass spectrometer (PerkinElmer, USA). The system was run with helium N55 as carrier gas with a flow rate of 20 psi (Saga, France). The column was an Elite VMS (30 m \times 1.4 μm \times 0.25 mm ID) (PerkinElmer, USA) featuring intermediate polarity. The split rate was set at 20 ml/min.

Optimal operating variables for the method were determined using an experimental design described in Section 2.4.

2.4. Chromatographic and headspace optimization process

Preliminary tests showed that we needed a relatively low temperature plateau (temperature 1: maximum 100°C) at the beginning of the analysis to retain the sevoflurane on our column (see Section 3.1 for details). We set the duration of this period at 1.5 min. By contrast, if we wanted a short analysis time we had to raise the temperature rapidly to lower the retention time of the other analytes (temperature 2). Finally, a third high temperature plateau was necessary to eliminate the solvent (undecane), which was strongly retained on the column (we set it at 200°C).

To optimize the chromatographic variables and the headspace procedure, we used an experimental design based on a Hadamard matrix (Table 1) to reduce the number of experiments necessary to evaluate the influence of seven headspace (HS) and gas chromatographic (GC) variables (four HS and three GC) on four decisive

characteristics of the method, which we call responses. These are listed below together with their ranges of variation:

- X_1 : HS thermostating temperature (65–75°C).
- X_2 : HS thermostating time (10–20 min).
- X_3 : HS pressurization time (2–6 min).
- X_4 : HS Needle injection times (0.2–0.3 min).
- X_5 : GC oven temperature 1 (60–80°C).
- X_6 : GC oven temperature ramp (25–45°C min^{–1}).
- X_7 : GC oven temperature 2 (125–175°C).

The experiments are summarized in Table 2.

The influence of the variation of these variables was estimated on four responses:

- R_1 : sevoflurane and chloroform peak resolution.
- R_2 : efficacy for the sevoflurane peak, based on the calculation of the height equivalent to a theoretical plateau.
- R_3 : sensitivity, based on the sum of the analyte peak areas.
- R_4 : analysis time, based on the retention time of the HFIP.

These experiments were conducted on a standard solution of 20 $\mu\text{g/ml}$ sevoflurane and HFIP and 12 $\mu\text{mol/ml}$ chloroform in blank plasma. We then plotted the cumulated Pareto graphics to evaluate the influence of these variables on each of the four responses.

This permitted us to determine best set of compromise values for these seven variables (see Section 3.1 for details).

2.4.1. Mass spectrometry

After scanning for ions with a mass-to-charge ratio (m/z) between 60 and 400, we determined three single-ion monitoring (SIM) sequences for each target molecule based on the most specific and abundant masses. The m/z ratios adopted for running the three SIM sequences were:

- SIM1 (sevoflurane): from 0 to 2.2 min: m/z 79, 131 and 181.
- SIM2 (chloroform): from 2.2 to 3.5 min: m/z 83, 85 and 118.
- SIM3 (HFIP): from 3.5 to 4.5 min: m/z 79, 99 and 129.

A solvent delay was set from 4.6 to 7.8 min at the retention time of undecane.

For quantitative analysis, all three m/z ions were monitored for each analyte and their ratios were checked with the software. The quantification process was performed using the sum of the three m/z ions.

2.5. Results analysis

The GC/MS system was interfaced with TurboMass GC/MS software (PerkinElmer, USA), and the samples were quantified using

Table 2
Summary of the conditions for each experiment.

Experiments	X_1 (°C)	X_2 (min)	X_3 (min)	X_4 (min)	X_5 (°C)	X_6 (°C min ^{–1})	X_7 (°C)
1	75	20	6	0,2	80	25	125
2	65	20	6	0,3	60	45	125
3	65	10	6	0,3	80	25	175
4	75	10	2	0,3	80	45	125
5	65	20	2	0,3	80	45	175
6	75	10	6	0,2	60	45	175
7	75	20	2	0,3	60	25	175
8	65	10	2	0,2	60	25	125

X_1 : HS thermostating temperature. X_2 : HS thermostating time. X_3 : HS pressurization time. X_4 : HS injection time. X_5 : GC temperature 1. X_6 : GC temperature ramp 1. X_7 : GC temperature 2.

Table 3
Summary of the major Pareto coefficients.

	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
Sevoflurane and chloroform peak resolution	n.s.	–10%	n.s.	–25%	–60%	n.s.	n.s.
Efficacy for the sevoflurane peak	n.s.	–10%	4%	–47%	–34%	n.s.	n.s.
Sensitivity	46%	15%	–6%	25%	n.s.	n.s.	n.s.
Analyze time	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	–87%	–11%	n.s.

Negatives coefficients: an increase of the factor lead to a decrease of the response; positives factors: an increase of the factor leads to an increase of the response. n.s.: non-significant.

Table 4
Relative standard deviation (RSD) estimation for the quantification of the two matrixes tested: whole blood matrix and plasma matrix.

	Whole blood matrix				Plasma matrix			
	Vacuum tube		Gas-tight syringe		Vacuum tube		Gas-tight syringe	
	Sevoflurane	HFIP	Sevoflurane	HFIP	Sevoflurane	HFIP	Sevoflurane	HFIP
Mean (μg/ml)	91.95	4.42	69.42	3.20	74.48	4.03	68.14	3.55
ETV (μg/ml)	12.62	0.61	14.24	0.61	6.40	0.30	2.08	0.23
RSD (%)	13.73	13.72	20.51	18.94	8.59	7.54	3.05	6.59

The results of the use of the two sample devices tested are shown: mean values ($n=3$), standard deviation (SD) and RSD.

to 110°C, and held for 1.5 min. The oven temperature was then increased to 200°C in a second ramp-up phase at 45°C/min, and held for a further 1.5 min (7.6 min for the temperature program and 12 min including re-equilibrium time).

3.2. Sampling technique and matrix selection

Table 4 summarizes the results of the sampling study.

The assays on whole blood showed high variability (coefficients of variation reaching 20%), and so they could not be exploited. By contrast, the assays on plasma samples presented coefficients of variation of 8% for sevoflurane and 7.5% for HFIP.

Analyte loss caused by the plasma processing step remained minimal. Sampling in vacuum tubes and then centrifuging the plasma and transferring it to headspace tubes did not cause any significant loss of analytes. The difference in assay results between the two collection methods (gas-tight syringes versus vacuum tubes) was approximately 10% (8.5% for sevoflurane and 12% for HFIP), and therefore remained within the bounds of variability obtained with the plasma sample assay.

Following these tests, we elected to carry out assays of plasma samples using the following protocol:

The patient's blood was sampled from a venous catheter directly in a 5 ml vacuum tube, taking extreme care to limit residual air. The blood was then promptly centrifuged for 3 min at 5000 rpm. 1 ml of plasma was recovered and transferred to a 20 ml headspace tube (Antelia, France), and 20 μl of the 600 μg/ml chloroform–undecane solution was added (the final concentration of internal standard being 12 μg/ml). The tube was immediately screwed hermetically tight with a Teflon-sealed cap and frozen at –20°C until analysis.

As there is binding of the HFIP in the erythrocytes (5) *in vivo* we did not conduct a spiking experiment on whole blood: this binding is impossible to reproduce *in vitro*. For this reason, and after the sampling technique and matrix selection experiments (Section 2.6), we decided to work on the quantification of the plasma phase of the analytes. This represents the biologically active phase when the substances can display toxicity.

3.3. Chromatograms and mass spectra

Fig. 2 presents the chromatograms of the compounds together with the relative proportions of the three ions chosen for each molecule.

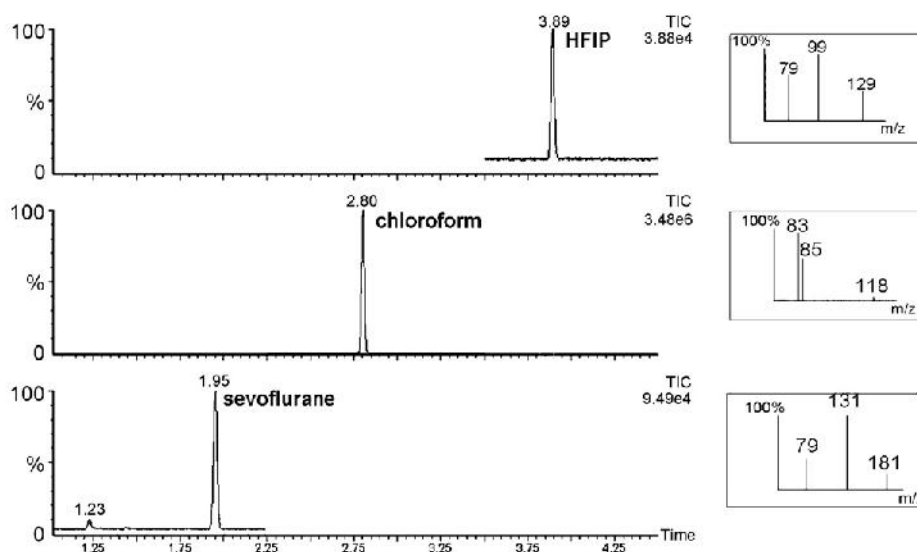


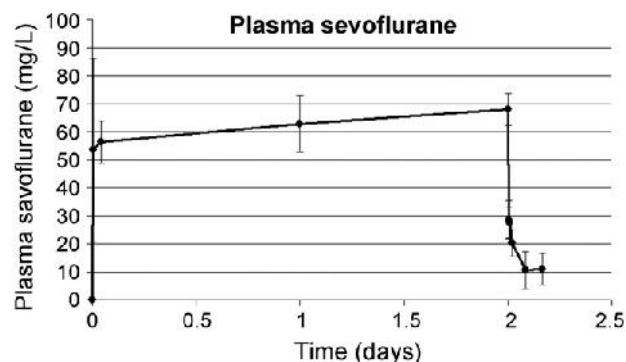
Fig. 2. Chromatograms and mass spectra (SIM mode) of a solution of 1 μg/ml of sevoflurane and HFIP and 12 μg/ml of chloroform.

Table 5

Within run and between run accuracy and precision of the assay method.

Compounds	Spiked ($\mu\text{g/ml}$)	Between run				Within run			
		Found ($\mu\text{g/ml}$)	SD ($\mu\text{g/ml}$)	RSD (%)	ETV (%)	Found ($\mu\text{g/ml}$)	SD ($\mu\text{g/ml}$)	RSD (%)	ETV (%)
Sevoflurane	1	0.99	0.07	7.03	0.40	1.05	0.12	11.67	5.44
	20	20.09	1.01	5.04	0.47	18.99	2.09	11.01	5.03
	150	151.50	5.07	3.35	1.00	151.50	5.07	3.35	1.00
HFIP	1	1.11	0.11	9.75	10.80	1.14	0.10	8.72	14.44
	20	19.51	1.62	8.33	2.47	19.13	1.03	5.37	4.35
	150	145.69	7.42	5.09	2.88	150.11	8.82	5.87	0.07

SD: standard deviation, RSD: relative standard deviation, ETV: error from theoretical value.

**Fig. 3.** Time-course patterns of plasma sevoflurane concentrations ($n=6$ mean \pm standard deviation).

Peak separation was excellent; the retention times of sevoflurane, chloroform and HFIP were 1.95, 2.80 and 3.89, respectively.

3.4. Validation

3.4.1. Linearity

The method was linear for a concentration range from 1 to 150 $\mu\text{g/ml}$. The calibration plot gave a coefficient of determination r^2 greater than 0.998.

3.4.2. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ)

LOD was 0.2 $\mu\text{g/ml}$ for sevoflurane and HFIP, and LOQ for both compounds was 1 $\mu\text{g/ml}$.

3.4.3. Precision and accuracy

The precision and accuracy results are reported in Table 5.

3.4.4. Sample stability in response to freezing

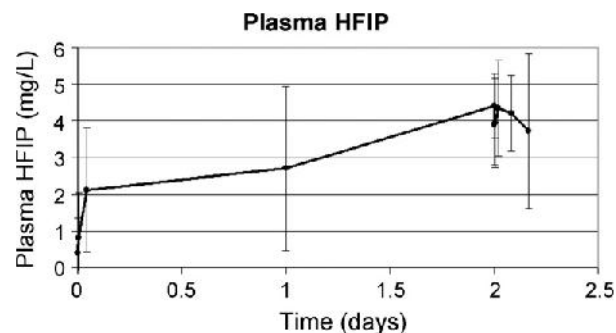
Stability in response to freezing was demonstrated by the variation of only 10% between the assays carried out on the day of sample preparation and those performed after 15 days in deep-freeze.

3.5. Application

Figs. 3 and 4 show the average plasma sevoflurane and HFIP concentrations across the six patients studied for 2 days of administration.

4. Discussion

We have developed a simple, rapid, inexpensive method that is well-g geared to pharmacokinetic studies as it can be used to assay sevoflurane and its metabolite HFIP simultaneously. Accorsi et al. [9] have also reported a method for simultaneously determining sevoflurane and HFIP levels that presents the advantage of being able to detect small enough quantities to be used for gauging nursing staff exposure to released anesthetic gases [11]. However, the

**Fig. 4.** Time-course patterns of plasma HFIP concentrations ($n=6$ mean \pm standard deviation).

authors employed technology (stir-bar sorptive extraction; SBSE) that is too expensive to make it a viable option for pharmacokinetic studies in anesthesia or sedation management. The system that Accorsi et al. used (coated stir-bar) to concentrate the samples and improve sensitivity relies on expensive, rarely employed components, whereas our technique uses fairly inexpensive consumables.

Our analytical technique also produces results very rapidly (4 min for the HFIP peak) and with a total time of 7.6 min (12 min including the re-equilibrium time); this takes 10.4 min off analysis time compared with Accorsi et al. [9] (18 min without the re-equilibrium time), while maintaining outstanding separation of compounds.

Focusing on HFIP quantification, several authors [9,12] have exploited techniques based on conjugated HFIP deglucuronidation, which is a key step in quantifying total matrix content of HFIP. However, our study is not focused on total HFIP levels. Using sevoflurane over periods greater than those used in anesthesia management may well lead to detoxification of this halogenated agent. At this point, two problems can arise: an increase in plasma sevoflurane levels due to a decrease in sevoflurane metabolism, or an increase in free HFIP due to less HFIP bonding with glucuronic acid, which could generate a risk of reaching toxic concentrations. No increase in free HFIP was observed. Therefore, as demonstrated by Kharrash et al. [6], free-form HFIP accounts for 15% of total HFIP. Thus total plasma concentrations of the HFIP metabolite can easily be estimated by extrapolating from the measured levels of free-form HFIP.

In addition, we sought a more suitable sevoflurane dilution solvent than the carbon disulfide used by Accorsi et al. [9]. Carbon disulfide solution presents several drawbacks, from its toxicity (risk phrases: R12 extremely flammable; R23 toxic by inhalation; R24 toxic in contact with skin and R25 toxic if swallowed) [13–17] to its low vaporization point (boiling point: 46 °C; vapor pressure (20 °C): 300 mmHg).

Undecane is a fairly non-toxic solvent (risk phrases: R36 irritating to eyes; R37 irritating to respiratory system and R38 irritating) that will dissolve sevoflurane and the internal standard (chloro-

form). Undecane also possesses a high vaporization point (boiling point: 196°C; vapor pressure (20°C): <0.4 mmHg), which offers the advantage of minimizing the potential for headspace saturation during the headspace ramp-up sequences. The experimental design work during the development of our method showed that the optimal temperature for completely vaporizing the analytes was 90°C. Carbon disulfide will vaporize at this temperature, but not undecane.

Also, the low vapor pressure and high boiling point of undecane help reduce the instability of the calibration solutions by minimizing solvent evaporation.

We also optimized the internal standard selected. Given that the analytes are highly volatile, we opted for a molecule presenting physical properties (and most importantly, vaporizability) that most closely matched those of the target analytes. The step in which the samples are handled before the assay is the most critical step in the method, as it is here that there is a risk of evaporation. Accordingly, we opted for chloroform. Unlike 1,4-dioxane, chosen by Yang et al. [10] (vapor pressure: 27 mmHg; boiling point: 120°C) and butyl chloride, used by Cunningham et al. [18] (vapor pressure: 101 mmHg; boiling point: 78°C), chloroform (vapor pressure: 159 mmHg; boiling point: 61.2°C) shares very similar physical properties with sevoflurane (vapor pressure: 157 mmHg; boiling point: 58.6°C) and HFIP (vapor pressure: 120 mmHg; boiling point: 58°C), thus ensuring similar behavior during the phases preceding injection into the chromatography system, and in particular during the headspace temperature and pressure programs.

We elected not to use another halogenated anesthetic such as enflurane, used by Accorsi et al. [9], since the patients in our study were ICU patients who regularly transited through other hospital wards where this gas might have been in use; this would have altered the signal responses of the internal standard during the assays.

The critical point in our method may be the plasma collection and separation protocol, as there is a risk that compounds may evaporate during sampling in vacuum tubes. Our research on the blood-sampling technique did not reproduce the values cited by Yang et al. [10] for the decrease in sevoflurane concentration estimated by a calculation based on the blood-gas partition coefficient (there are no published figures on the blood-gas partition coefficient of HFIP). Yang et al. reported a 17% drop in sevoflurane concentration at equilibrium (at a residual volume of 0.7 ml for 5 ml of liquid). In our study, a small volume of air remained in the vacuum tubes (approximately 0.5 ml for 5 ml of liquid); the differences between the values obtained with the sample taken with the gas-tight syringes (without residual air) and those taken with the vacuum tubes were estimated at 8.5% and 12% for sevoflurane and HFIP, respectively. These figures are comparable to the coefficients of variation values of 8–10% determined when validating the precision of the method. We therefore opted to ignore this effect. There are several possible explanations for this difference. The blood-gas partition coefficient of 0.68 does not match the conditions of our sampling protocol, as it corresponded to a temperature of 37°C [19]. However, in our sampling and centrifugation procedure, there is a drop in sample temperature, which leads to an increase in the blood-gas partition coefficient and thus reduces the effect of evaporation. Also, 0.68 was a value calculated on whole blood, whereas with our method, the whole blood is centrifuged, so

that only plasma is left in contact with the residual air. The literature does not cite any plasma-gas partition coefficients. Finally, we took special care to ensure that the sequence of operations following blood collection was completed as quickly as possible to keep residual air volume to a minimum. Taken together, these measures will tend to minimize the risks of vaporization.

The first test runs using this technique confirmed that it was well-gearred to our study. Figs. 3 and 4 show there was no build-up of either sevoflurane or HFIP in the patients' plasma. Sevoflurane concentrations plateaued at an average of 75 µg/ml in about 6 h of inhalation. The figures also highlight how sevoflurane levels quickly tail off (the peak at plateau concentration was halved in only 5 min after stopping product inhalation), consistent with the speed at which the patients wake up. Free HFIP levels remained low, averaging less than 4 µg/ml. Extrapolating from Kharash et al. [6], 4 µg/ml free HFIP would correspond to a HFIP total plasma concentration of 26.7 µg/ml. There are apparently none of the glucuronidation process accumulation or saturation effects that might have been feared under extended periods of sedation.

5. Conclusion

The technique we have developed for simultaneously determining sevoflurane and HFIP levels is particularly well adapted to gathering the data required for pharmacokinetic modeling. It possesses the necessary degree of sensitivity, while at the same time remaining linear for the high plasma concentrations reached in patients sedated for 48 h periods. Preliminary assays performed with the method have demonstrated that there is no product accumulation in patient plasma. These results, which have been incorporated into a larger-scale clinical trial, are expected to make it possible to describe pharmacokinetic models for sevoflurane and HFIP in this indication.

References

- [1] G. Landoni, O. Fochi, G. Torri, *Curr. Vasc. Pharmacol.* 6 (2008) 108.
- [2] P.V. Sackey, C.R. Martling, F. Granath, P.J. Radell, *Crit. Care Med.* 32 (2004) 2241.
- [3] A. Tempia, M.C. Olivei, E. Calza, H. Lambert, L. Scotti, E. Orlando, S. Livigni, E. Guglielmotti, *Anesth. Analg.* 96 (2003) 1056.
- [4] M. Enlund, H. Lambert, L. Wiklund, *Acta Anaesthesiol. Scand.* 46 (2002) 506.
- [5] E.D. Kharasch, A.S. Armstrong, K. Gunn, A. Artru, K. Cox, M.D. Karol, *Anesthesiology* 82 (1995) 1379.
- [6] E.D. Kharasch, M.D. Karol, C. Lanni, R. Sawchuk, *Anesthesiology* 82 (1995) 1369.
- [7] H. Wissing, I. Kuhn, S. Rietbrock, U. Fuhr, *Br. J. Anaesth.* 84 (2000) 443.
- [8] C.C. Lu, C.S. Tsai, S.T. Ho, W.Y. Chen, C.S. Wong, J.J. Wang, O.Y. Hu, C.Y. Lin, *Anaesthesia* 58 (2003) 951.
- [9] A. Accorsi, B. Morrone, M. Benzo, C. Gandini, G.B. Raffi, F.S. Violante, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 131.
- [10] N.C. Yang, K.L. Hwang, C.H. Shen, H.F. Wang, W.M. Ho, *J. Chromatogr. B* 759 (2001) 307.
- [11] A. Accorsi, A. Barbieri, G.B. Raffi, F.S. Violante, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 74 (2001) 541.
- [12] S.E. Morgan, E.J. Frink, A.J. Gandolfi, *Anesthesiology* 80 (1994) 201.
- [13] C.C. Huang, *Acta Neurol. Taiwan* 13 (2004) 3.
- [14] R.C. Sills, G.J. Harry, W.M. Valentine, D.L. Morgan, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207 (2005) 245.
- [15] Z.P. Wang, K.Q. Xie, H.Q. Li, Chin. J. Ind. Hyg. Occup. Dis. 23 (2005) 139.
- [16] V. Morvai, E. Szakmary, G. Ungvary, J. Toxicol. Environ. Health A 68 (2005) 797.
- [17] R. Vermeulen, B.A. Jonsson, C.H. Lindh, H. Kromhout, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 78 (2005) 663.
- [18] D.D. Cunningham, J. Webster, D. Nelson, B. Williamson, *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.* 668 (1995) 41.
- [19] D.P. Strum, E.I. Eger II, *Anesth. Analg.* 66 (1987) 654.

Article 2

*A pharmacokinetic study of 48-hour sevoflurane
inhalation using a disposable delivery system
(AnaConDa©) in ICU patients*

Perbet S, **Bourdeaux D**, Sautou V, Péreira B, Constantin JM, Chopineau J, Bazin J-E
Soumis à Intensive Care Medecine, juillet 2012

**A pharmacokinetic study of 48-hour sevoflurane inhalation using a disposable delivery system
(AnaConDa[®]) in ICU patients**

Sébastien Perbet^{1,2}, Daniel Bourdeaux^{3,4}, Valérie Sautou^{3,4}, Bruno Pereira⁵, Jean-Michel Constantin^{1,2}, Jean Chopineau^{3,4}, Jean-Etienne Bazin¹

¹ CHU Clermont-Ferrand, Intensive Care Unit, Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, CHU Estaing, F-63000 Clermont-Ferrand, France

² Univ. Clermont 1, D2R2, EA-7281, Faculty of Medicine, 28 Place Henri Dunant, F-63001 Clermont-Ferrand, France

³ CHU Clermont-Ferrand, Department of Pharmacy, Gabriel-Montpied Hospital, F-63003 Clermont-Ferrand, France

⁴ Univ. Clermont 1, Faculty of Pharmacy, Laboratory of Clinical Pharmacy and Biotechnics, 28 Place Henri Dunant, F-63001 Clermont-Ferrand, France

⁵ CHU Clermont-Ferrand, Biostatistics Unit, DRCI, Gabriel-Montpied Hospital, F-63003 Clermont-Ferrand, France

Corresponding author:

Dr Sébastien PERBET, Réanimation adultes, CHU Estaing, CHU Clermont-Ferrand, 1 place Lucie-Aubrac, 63003 Clermont-Ferrand Cedex 1

Tel : + 33 473750501

Fax : + 33 473750500

E-mail: sperbet@chu-clermontferrand.fr

Keywords: volatile anesthetics; pharmacokinetics, model; AnaConDa[®], Anaesthetic Conserving Device[®].

Abstract:

Purpose:

Little is known regarding sevoflurane kinetics and toxicity during long-term sedation of intensive care unit (ICU) patients using the AnaConDa[®] system. The objective of the present study was to establish a pharmacokinetic description of 48-h sevoflurane administration, and to estimate plasma concentrations of metabolites.

Methods:

Forty-eight hour sedation with sevoflurane vaporized via an AnaConDa[®] device, with an end-tidal concentration objective of 1.5% (v/v), was initiated in 12 non-obese patients who did not have hepatic or renal failure but who required sedation for more than 48 h in our ICU. Plasma sevoflurane, hexafluoroisopropanol, and fluoride concentrations were determined over this time. The pharmacokinetic analysis was performed using non-linear Kinetic Pro software (Wgroupe, Pommiers la Placette, France).

Results:

The mean concentration of sevoflurane was 76 mg/l at 24 h and 70 mg/l at 48 h. Wash-out of plasma sevoflurane correlated with a rapid decrease in the mean end-tidal sevoflurane level. The mean free plasma fraction of hexafluoroisopropanol never exceeded 8 mg/ml. The mean fluoride concentration was 0.8 $\mu\text{mol/l}$ on day 0, 51.7 $\mu\text{mol/l}$ on day 1, and 68.1 $\mu\text{mol/l}$ on day 2 ($p < 0.0001$). The distribution volume was 53 l, the elimination constant 2.9 h^{-1} , the transfer constant from compartment 1 to compartment 2 (K_{1-2}) 1.2, the K_{2-1} 0.26 h^{-1} , the half-life of elimination 3.78 h, and the total clearance 156 l/h.

Conclusions:

Forty-eight hours of sevoflurane inhalation using an AnaConDa[®] system facilitates rapid drug wash-out without accumulation of toxic metabolites.

Body Text

Introduction

Critically ill patients often require sedative drugs to reduce anxiety and agitation during mechanical ventilation, and when invasive therapeutic and diagnostic procedures are applied [1]. No optimal sedative agent has been defined for such patients [2]. The sedative agents most commonly used in intensive care units (ICUs) are midazolam and propofol. A sedation method without significant accumulation risk, organ-dependent elimination, and prolongation of wakeup time would be useful for sedation of critically ill patients. Volatile anesthetics can be used for sedation of ICU patients [3]. In this setting, however, anesthetic machines capable of delivering volatile anesthetics may not be available, or those that are available may be inadequate for this purpose. For example, not all ICUs have advanced ventilators featuring non-rebreathing circuitry allowing administration of cost-effective and environmentally acceptable volatile anesthetics under challenging situations. One disposable anesthetic agent delivery system, the Anesthetic-Conserving Device (AnaConDa[®] [ACD]; SedanaMedical, Sundbyberg, Sweden), is a modified heat–moisture exchanger (HME) containing a carbon filter. A liquid volatile anesthetic agent delivered using a standard syringe pump is evaporated on the patient side of the filter, and partial rebreathing of exhaled sevoflurane is accomplished by adsorbance–desorbance to/from the same filter [4-6].

Detailed knowledge of volatile anesthetic kinetics and toxicity is important to ensure appropriate clinical use. The wash-in and wash-out kinetics of sevoflurane, and the plasma concentrations of the main metabolites thereof [hexafluoroisopropanol (HFIP) and fluoride], have been described under conditions where anesthetic procedures less than 6 h in duration were employed. A plasma fluoride concentration of 50 $\mu\text{mol/l}$, attained after short-term methoxyflurane administration, has been considered to be the threshold for development of polyuric acute renal failure [7]. Use of an ACD renders it possible to administer a volatile anesthetic without use of an advanced ventilator; the employment of sevoflurane to this end may allow ICU sedation to be maintained for a longer time than hitherto employed. Renal function remained unchanged during the 48 h that followed approximately 12 h of sevoflurane sedation [8], but animal studies have suggested that sevoflurane may not be safe if used for an extremely long period or at a high concentration [9]. The kinetics of long-term sevoflurane sedation remain unknown. Their elucidation could potentially enable optimization of prolonged ACD sedation in ICU patients.

The objective of the present study was thus to establish a pharmacokinetic description of 48-h sevoflurane administration employing an ACD, and to examine plasma concentrations of sevoflurane metabolites.

Materials and Methods

The present study was approved by the appropriate Institutional Review Board (Comité de Protection des Personnes Sud-Est VI, Clermont-Ferrand, France; approval no. NCT 01196754) and written informed consent was required from patient's next of kin for inclusion in the study. Twelve non-obese patients (of either gender) who did not have hepatic or renal failure (i.e., with a creatinine clearance rate of over 60 ml/min), but who required sedation for more than 48 h in an ICU, were recruited. All relevant clinical, demographic, and biological data were recorded.

Protocol

All patients were managed via orotracheal intubation, insertion of a radial artery line, and/or volume-controlled ventilation. Both the inspired oxygen concentration and the required PEEP value were selected with reference to patient-specific ventilation requirements. Both the ventilatory frequency and tidal volume remained unchanged during wash-in and wash-out of sevoflurane. Sedation was maintained by midazolam and remifentanyl infusion, at the discretion of the attending physician, both before and after sevoflurane sedation. An HME was optionally employed either before or after ACD sedation. Continuous intravenous remifentanyl infusion was sometimes given during the 48 h of sevoflurane inhalation to ensure that a Richmond Agitation-Sedation Scale score between -2 and -3 was maintained, and a behavioral pain score less than 5 was also attained [10, 11]. Hemodynamic stability (judged by heart rate and arterial pressure measurements) was controlled, and norepinephrine infusions were used to deal with the hemodynamic effects of variation in sedation depth upon transition from intravenous anesthesia to inhalation of anesthetic drugs. Using the ACD, the infusion rates for liquid sevoflurane were determined using the desired end-tidal anesthetic concentration, patient body weight, and ventilator settings, employing a nomogram provided by the manufacturer. The nomogram is a table built on the model of Belda and colleagues [12], yielding one infusion rate for the first 10 min, and one for the following hour, for patients differing in body weight. Ventilatory volume was maintained constant during the 48 h to avoid induction of variation in the amount of sedative required [13]. Each individual infusion rate was determined by interpolation of patient weight between the weight strata of the nomogram, and each syringe pump (Alaris CC, Alaris Medical UK Ltd., Basingstoke, UK) was adjusted accordingly. The ACD settings aimed to achieve an end-tidal concentration of 1.5% (v/v) sedative in the steady state. Inspired and end-tidal gas concentrations were continuously monitored using a Philips IntelliVue™ MP70 instrument attached to an anesthetic gas module (M1019A, Philips Healthcare, Andover, MA).

The infusion rate was set using the nomogram for the first 10 min; empty tubing was not purged. After detection (by the monitor) of sevoflurane in the breathing circuit, blood samples were collected after 5 min, 1 h, 6 h, 24 h, and 48 h. Further samples were collected 5 min, 10 min, 30 min, 2 h, 4 h, and 6 h after cessation of sevoflurane delivery. Blood was collected via a venous catheter directly into a 5 ml vacuum tube, with extreme care being taken to limit residual air, as previously described [14]. Each sample was promptly centrifuged for 3 min at 5,000 rpm. A 1 ml sample of plasma was transferred to a 20 ml headspace tube (Antélia, Décines-Charpieu, France), and 20 µl of an internal chromatographic standard solution (600 µg/ml chloroform in undecane) was added. The tube was immediately hermetically sealed using a Teflon-sealed cap and frozen at -20°C until analysis.

At the time of each blood sampling, end-tidal CO₂, and inspired and end-tidal sevoflurane concentrations, were noted. The expiration volume/min, as measured by the ventilator, was also recorded. These data were compared to baseline values. The tubing running from the syringe to the ACD was empty at the commencement of infusion to ensure the complete absence of sevoflurane until the required time of delivery. Sevoflurane was detected by the anesthesia gas monitor within 1 min after delivery of liquid drug to the ACD. The time of first detection of gas served as the startpoint for kinetic calculations. Each ACD filter was changed after 24 h of vaporization, just after blood sampling.

Serum urea and creatinine values were monitored during the 7 days following commencement of inhalation. Acute kidney injury was defined according to the Acute Kidney Injury Network (AKIN) criteria [15].

Plasma Sevoflurane, HFIP, and fluoride quantitation

Sevoflurane and HFIP were quantified as previously described [14], using a chromatograph (Autosystem, Perkin Elmer Corp., San Jose, US) coupled to a headspace system (HS40, Perkin Elmer Corp., San Jose, US) and a mass spectrometer (Clarus 500, Perkin Elmer Corp., San Jose, US). Separation was achieved using an Elite VMS (30 m × 1.4 µm × 0.25 mm ID) capillary column (Perkin Elmer Corp., San Jose, US) of intermediate polarity. Carrier gas (helium) was delivered at 15 psi to the head of the column. The oven temperature was programmed to be 60°C for 1.5 min, to next increase over 1.5 min at 45°C/min until attainment of 110°C, and to finally increase over 1.5 min at 45°C/min to reach 200°C. In the headspace, each sample was heated to 95°C over 20 minutes and next pressurized via carrier gas injection over 3 minutes before injection into the column over 6 s. A calibration curve was constructed using five standards (1, 5, 20, 50, and 150 µg/ml of sevoflurane and HFIP, with 12 µg/ml chloroform as an internal standard).

Total plasma fluoride levels were measured 0 h, 24 h, and 48 h after commencement of sevoflurane treatment. An ionometric detector (Sevenmulti, Mettler Toledo, Viroflay, France) fitted with the appropriate electrode (Mettler Toledo, Viroflay, France) was used to quantify plasma fluoride levels. A calibration curve was constructed using fluoride standards ranging from 1-70 $\mu\text{mol/l}$. Four hundred microliters of TISAB activation solution (Mettler Toledo, Viroflay, France) were added to each 4 ml volume of patient plasma prior to analysis. The linearity and accuracy of the method were verified (data not shown).

Pharmacokinetic model

The aim of the present study was to establish a pharmacokinetic study useful in the treatment of non-obese patients without hepatic or renal failure. A 10% leakage of sevoflurane via the ACD is effectively assumed [16, 17]. Thus, to evaluate the amount of sevoflurane effectively absorbed, we recorded sevoflurane syringe flow over time and calculated the total amount of sevoflurane given. From each value, 10% was deducted to allow for ACD leakage.

The pharmacokinetic analysis was performed using non-linear Kinetic Pro pharmacokinetics software (Wgroupe, Pommiers la Placette, France) [18, 19]. The pharmacokinetic data used to establish the study were the absorption constant (K_a), the intercompartmental exchange constants (K_{12} and K_{21}), the volume of distribution (V_d), the total elimination constant (K_e), the peak plasma concentration measured (C_{max}), and the time taken to reach C_{max} (T_{max}). As previously studied [20, 21], we used a two-compartment model to evaluate the pharmacokinetic characteristics. We had to test the residual error of the one, two and three compartments models to confirm that the two-compartment model is the most adapted model.

Study sample size

Sample size estimation was difficult because inter-patient variability was unknown. Thus, we conducted power analyses to determine whether the sample size was adequate to allow changes to be detected over time, and to estimate an intraclass correlation coefficient (ICC). Data from 12 patients obtained at nine timepoints (108 observations) were available. Such a sample size allows calculation of an exact confidence interval of the desired width ($w=0.2$) to afford an ICC close to 0.9 (H_0 : ICC=0.7) when a two-way ANOVA model for repeated measures is used, with a power of 85% [22].

Statistical analysis

A repeated-measures ANOVA test (used with the Friedman test when appropriate), followed by the Tukey-Kramer test, was employed to compare differences between and within groups. This allowed significant

changes in variables over time to be detected; each patient served as his or her own control. Multivariate analysis using linear mixed models was also performed to assess the evolution of each parameter. When employing these models, we always considered random patient effects (in terms of intercept and slope). The residual normality of all models was checked. The significance threshold was 0.05 for comparison of the values.

Results

Three women and nine men were enrolled in the study. Mean patient age was 54 ± 12 years, and the mean simplified acute physiology score II was 44 ± 12 . The principal reasons for ICU admission were surgical in five patients and medical in seven.

The mean doses of sevoflurane potentially absorbed were 288.8 ± 53.5 g during the first day and 247.2 ± 53.0 during the second day. The mean total dose absorbed by the pulmonary route during the 48 h of the procedure was 536.0 ± 89.5 g (Table 1). With a residual error of 7%, the bicompartamental model was chosen to describe the distribution and elimination of sevoflurane after pulmonary administration via the ACD system. The pharmacokinetic parameters of the bicompartamental model are shown in Table 2.

The mean concentrations of sevoflurane were 77.5 ± 10.7 mg/l at 24 h and 70.5 ± 10.5 mg/l at 48 h, and decreased rapidly after the end of inhalation; the levels at 24 h and 48 h did not differ significantly ($p=0.183$) (Figure 1).

The mean values of plasma HFIP were: 2.0 ± 1.7 mg/ml at 5 min, 4.0 ± 2.5 mg/ml at 1 h, 4.0 ± 2.3 mg/ml at 6 h, 4.7 ± 3.5 mg/ml at 24 h and 4.4 ± 3.6 mg/ml at 48 h after commencement of inhalation; and 4.6 ± 2.8 mg/ml at 5 min, 5.0 ± 5.2 mg/ml at 10 min, 7.6 ± 12.0 mg/ml at 30 min, 3.9 ± 5.0 mg/ml at 2 h, 1.3 ± 2.3 mg/ml at 4 h, and 1.2 ± 2.1 mg/ml at 6 h after sevoflurane cessation.

Wash-out of plasma sevoflurane concentration was associated with decreases in mean end-tidal sevoflurane levels (the F_e values) after cessation of sevoflurane inhalation (Figure 2).

The mean plasma fluoride values were 0.7 ± 0.7 $\mu\text{mol/l}$ at day 0, and 51.7 ± 7.5 $\mu\text{mol/l}$ and 68.1 ± 7.4 $\mu\text{mol/l}$ on days 1 and 2, respectively ($p<0.0001$).

The mean urea values measured on days 1 to 7 did not differ significantly (Figure 3). The mean creatinine values were significantly lower on day 5 ($p=0.005$), day 6 ($p=0.053$), and day 7 ($p=0.035$) than on day 0. No kidney injury was detected. Use of the AKIN criteria caused all patients to be rated as of “no AKI” status at all times.

Discussion

We conducted a pharmacokinetic study on 48-h sevoflurane sedation delivered using an ACD affording a high and constant rate of inhalation, and yielding a stable sevoflurane concentration without accumulation of drug metabolites. To the best of our knowledge, this is the first report to deal with the pharmacokinetics of sevoflurane during long-term (at least 24-h) sedation employing the ACD device. We further constructed profiles of the plasma concentrations of two sevoflurane metabolites (HFIP and fluoride) over the 48 h.

ACD is a popular technique by which sevoflurane is administered outside the surgical theatre, and is an alternative to use of a conventional vaporizer. Delivery of sevoflurane by an ACD is constant; the delivery rate needs to be adjusted only once every hour [23]. Long-term sedation and possible accumulation of sevoflurane metabolites when using an ACD were evaluated in the recent study of Mesnil *et al* [24]. The cited authors found that inhalation of sevoflurane during long-term sedation decreased wake-up and extubation times and post-extubation morphine consumption, and increased the quality of awakening, compared to standard intravenous sedation employing propofol or midazolam. We chose 48 h as our study duration as the minimum required to achieve effective sedation and the maximum permissible for maintenance of deep sedation, thus with a Richmond Agitation-Sedation Scale score of -3 or -2 in more than 50% of patients, to avoid unnecessary sedation [25]. This is a standard protocol for management of acute pathology in the ICU when it is necessary to maintain constant sedation. End-tidal sevoflurane tension mirrored arterial levels, whereas measured inspired tension was lower than either expired or arterial tension [26]. We aimed to maintain a constant end-tidal concentration of 1.5% (v/v) sevoflurane because this was effective to hold the Richmond Agitation-Sedation Scale score between -2 and -3, as has been achieved using continuous intravenous remifentanyl infusion in other studies [27, 28]. However, in 25 mechanically ventilated patients for whom deep sedation failed (Ramsay score <5 despite midazolam 10 mg/h and fentanyl 400 mg/h), a sevoflurane end-tidal concentration of 1.0% (v/v) [0.8–1.2%(v/v)] over 2 days allowed the required sedation level to be achieved [29].

Calculation of pharmacokinetic values using the end-tidal and inspired concentrations of sevoflurane given via conventional protocols is inappropriate when the ACD system is used, because of re-inhalation of volatile anesthetic from the carbon filter of the device and interpretation of the last dip in the concentration curve as inspiratory concentration by the gas monitors [20, 21, 30]. Thus, we developed a new pharmacokinetic based on measured plasma sevoflurane concentrations. Enlund created a pharmacokinetic model of sevoflurane administration using the ACD system, but the cited work did not investigate plasma sevoflurane concentrations, or those of the principal metabolite of the drug, either during administration or afterwards [31]. Our

pharmacokinetic model is based on measured sevoflurane and HFIP plasma concentrations. However, several reports have described sevoflurane pharmacokinetics when shorter protocols without use of an ACD device were implemented. Kharasch *et al.* studied sevoflurane metabolism during a conventional anesthetic procedure [32]. The values of elimination half-life (2.8 h in the cited work versus 3.78 h in our present work) and distribution volume (42.4 l versus 53 l, respectively) were similar to the data we obtained. This suggests that the pharmacokinetic properties of sevoflurane are not modified during the long inhalation protocols permitted by use of an ACD device. However, the clearance values differed (156 l/h in the present study versus 32 l/h in the cited work). This may be explained by the fact that we calculated total sevoflurane clearance as the sum of renal and pulmonary elimination after the end of inhalation. The cited authors calculated only metabolic clearance. Finally, our work suggests that most sevoflurane is eliminated by the pulmonary route.

A potential risk during long-term sedation is a change in metabolism of the gas and/or HFIP in plasma. Accumulation of the sedative or saturation of the cytochrome P450 E2 biotransformation process may occur [32]. Saturation of conjugation of HFIP with glucuronic acid prior to urinary elimination might also take place, thus raising the free HFIP concentration and creating a potentially toxic effect. Finally, we showed that determination of HFIP concentration was a good surrogate of any change in sevoflurane metabolism.

The wash-in kinetics of sevoflurane are fast, as described by Stureson in patients undergoing shorter periods of sedation [26]. We observed two kinetic phases during wash-in (corresponding to the two compartments of the pharmacokinetic model detailed below). One phase was very fast (between 0 and 5 min) followed by a slower phase with a point of inflexion between 5 and 10 min. Sevoflurane concentration attained a maximum at either 24 h or 48 h, depending on the individual patient, but the concentrations at 24 h and 48 h were not significantly different ($p=0.183$). The mean time taken to reach 80% of the C_{max} value (at 24 h) was about 33 minutes. However, although the end-tidal sevoflurane concentration was set to 1.5% (v/v) for all patients, some variation in sedative concentrations at 24 h was noted (77.5 ± 10.5 mg/l). This renders it difficult to predict plasma concentrations using only end-tidal values. Several factors (including weight, age, and gender) may affect repeatability of plasma estimations, but our patient number was low and any such association would not be statistically significant. Further, ICU patients are very heterogeneous in nature and undergo multiple treatments that may interfere with drug distribution and/or metabolism.

Fast sevoflurane elimination and non-accumulation of free HFIP may be noted on all the individual concentration-time curves of Figure 1. As observed previously [32], sevoflurane metabolism is very fast. HFIP was detected after only 5 min from commencement of drug inhalation in a few patients. Any possible correlation

between wash-out and awakening could not be evaluated because all patients required continued sedation using midazolam or propofol. Our study did not seek to evaluate drug levels upon awakening, but rather to gather pharmacokinetic data. However, elimination remained fast even when a high concentration of sevoflurane was given.

Sevoflurane metabolism produces inorganic fluoride, Compound A, and HFIP. Compound A is produced only in anesthesia circuits employing rebreathing and when soda lime is used in the anesthesia ventilators to be found in operating theatres [33]. In the ICU, the ACD system does not employ soda lime and Compound A is not produced. In the study by Higuchi, serum inorganic fluoride concentrations exceeded 50 $\mu\text{mol/l}$ during prolonged sevoflurane anesthesia in volunteers, but without any indication of clinically significant renal damage in patients without pre-existing renal disease [34]. In the present study, a significant increase in urine inorganic fluoride levels was observed during 48 h of sedation. The mean maximum plasma fluoride concentration was $71.7 \pm 21.5 \mu\text{mol/l}$, thus above 50 $\mu\text{mol/l}$, the level previously reported by Cousins and Mazze to cause nephrotoxicity [35]. High levels of Compound A cause dose-dependent nephrotoxicity in rats to an extent greater than that associated with high-level fluoride exposure [36]. No kidney injury was noted after 10 h of anesthesia with sevoflurane associated with production of Compound A [37]. Sevoflurane administration over 48 h using an ACD has no clinical effect on renal function or creatinine levels. A limitation of our study is that fluoride levels after 48 h of sedation were not measured. Thus, decreases in fluoride concentrations after the 48 h were not assessed. The measured fluoride levels were obtained in the context of an elevated end-tidal sedative concentration, and may be the maximal possible values obtainable using standard 48-h sedation.

The present study shows that fast sevoflurane elimination is associated with a decrease in end-tidal drug concentration after cessation of prolonged sedation. The rapidity of wash-out suggests that prolonged sedation with sevoflurane may allow the duration of mechanical ventilation to be reduced, thus explaining the decreasing of wake-up and extubation times of a previous study [24]. Further work is necessary to promote sedation for longer than 48 h, using the ACD system, in patients with renal or hepatic failure.

References

- 1. Jacobi J, Fraser GL, Coursin DB, Riker RR, Fontaine D, Wittbrodt ET, Chalfin DB, Masica MF, Bjerke HS, Coplin WM et al. (2002) Clinical practice guidelines for the sustained use of sedatives and analgesics in the critically ill adult. Crit Care Med 30:119-141.**
- 2. Ostermann ME, Keenan SP, Seiferling RA, Sibbald WJ (2000) Sedation in the intensive care unit: a systematic review. JAMA 283:1451-1459.**
- 3. Sackey PV, Martling CR, Granath F, Radell PJ (2004) Prolonged isoflurane sedation of intensive care unit patients with the Anesthetic Conserving Device. Crit Care Med 32:2241-2246.**
- 4. Dahm SL, Steptoe P, Luttrupp HH, Reinstrup P (1998) Charcoal as an airway isoflurane reflection filter. Eur J Anaesthesiol 15:230-233.**
- 5. Enlund M, Wiklund L, Lambert H (2001) A new device to reduce the consumption of a halogenated anaesthetic agent. Anaesthesia 56:429-432.**
- 6. Thomasson R, Luttrupp HH, Werner O (1989) A reflection filter for isoflurane and other anaesthetic vapours. Eur J Anaesthesiol 6:89-94.**
- 7. Taves DR, Fry BW, Freeman RB, Gillies AJ (1970) Toxicity following methoxyflurane anesthesia. II. Fluoride concentrations in nephrotoxicity. JAMA 214:91-95.**
- 8. Rohm KD, Mengistu A, Boldt J, Mayer J, Beck G, Piper SN (2009) Renal integrity in sevoflurane sedation in the intensive care unit with the anesthetic-conserving device: a comparison with intravenous propofol sedation. Anesth Analg 108:1848-1854.**

9. Kusume Y (1999) [Inorganic fluoride concentrations and their sequential changes in the five layers of the kidney in rabbits after sevoflurane or methoxyflurane anesthesia]. *Masui* 48:1202-1210.
10. Ely EW, Truman B, Shintani A, Thomason JW, Wheeler AP, Gordon S, Francis J, Speroff T, Gautam S, Margolin R et al. (2003) Monitoring sedation status over time in ICU patients: reliability and validity of the Richmond Agitation-Sedation Scale (RASS). *JAMA* 289:2983-2991.
11. Payen JF, Bru O, Bosson JL, Lagrasta A, Novel E, Deschaux I, Lavagne P, Jacquot C (2001) Assessing pain in critically ill sedated patients by using a behavioral pain scale. *Crit Care Med* 29:2258-2263.
12. Belda JF, Soro M, Badenes R, Meiser A, Garcia ML, Aguilar G, Marti FJ (2008) The predictive performance of a pharmacokinetic model for manually adjusted infusion of liquid sevofluorane for use with the Anesthetic-Conserving Device (AnaConDa): a clinical study. *Anesth Analg* 106:1207-1214.
13. Berton J, Sargentini C, Nguyen JL, Belii A, Beydon L (2007) AnaConDa reflection filter: bench and patient evaluation of safety and volatile anesthetic conservation. *Anesth Analg* 104:130-134.
14. Bourdeaux D, Sautou-Miranda V, Montagner A, Perbet S, Constantin JM, Bazin JE, Chopineau J (2010) Simple assay of plasma sevoflurane and its metabolite hexafluoroisopropanol by headspace GC-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878:45-50.
15. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A (2007) Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 11:R31.
16. Kharasch ED (1995) Biotransformation of sevoflurane. *Anesth Analg* 81:S27-38.

17. Meiser A, Bellgardt M, Belda J, Rohm K, Laubenthal H, Sirtl C (2009) Technical performance and reflection capacity of the anaesthetic conserving device--a bench study with isoflurane and sevoflurane. *J Clin Monit Comput* 23:11-19.
18. Iliadis A, Brown AC, Huggins ML (1992) APIS: a software for model identification, simulation and dosage regimen calculations in clinical and experimental pharmacokinetics. *Comput Methods Programs Biomed* 38:227-239.
19. Petricoul O, Claret L, Barbolosi D, Iliadis A, Puozzo C (2001) Information tools for exploratory data analysis in population pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 28:577-599.
20. Rietbrock S, Wissing H, Kuhn I, Fuhr U (2000) Pharmacokinetics of inhaled anaesthetics in a clinical setting: description of a novel method based on routine monitoring data. *Br J Anaesth* 84:437-442.
21. Wissing H, Kuhn I, Rietbrock S, Fuhr U (2000) Pharmacokinetics of inhaled anaesthetics in a clinical setting: comparison of desflurane, isoflurane and sevoflurane. *Br J Anaesth* 84:443-449.
22. Walter SD, Eliasziw M, Donner A (1998) Sample size and optimal designs for reliability studies. *Stat Med* 17:101-110.
23. Soro M, Badenes R, Garcia-Perez ML, Gallego-Ligorit L, Marti FJ, Aguilar G, Belda FJ (2010) The accuracy of the anesthetic conserving device (AnaConDa(c)) as an alternative to the classical vaporizer in anesthesia. *Anesth Analg* 111:1176-1179.
24. Mesnil M, Capdevila X, Bringuier S, Trine PO, Falquet Y, Charbit J, Roustan JP, Chanques G, Jaber S (2011) Long-term sedation in intensive care unit: a randomized comparison between inhaled sevoflurane and intravenous propofol or midazolam. *Intensive Care Med.*

25. Payen JF, Chanques G, Mantz J, Hercule C, Auriant I, Leguillou JL, Binhas M, Genty C, Rolland C, Bosson JL (2007) Current practices in sedation and analgesia for mechanically ventilated critically ill patients: a prospective multicenter patient-based study. *Anesthesiology* 106:687-695; quiz 891-682.
26. Stureson LW, Johansson A, Bodelsson M, Malmkvist G (2009) Wash-in kinetics for sevoflurane using a disposable delivery system (AnaConDa) in cardiac surgery patients. *Br J Anaesth* 102:470-476.
27. Rohm KD, Wolf MW, Schollhorn T, Schellhaass A, Boldt J, Piper SN (2008) Short-term sevoflurane sedation using the Anaesthetic Conserving Device after cardiothoracic surgery. *Intensive Care Med* 34:1683-1689.
28. Migliari M, Bellani G, Rona R, Isgro S, Vergnano B, Mauri T, Patroniti N, Pesenti A, Foti G (2009) Short-term evaluation of sedation with sevoflurane administered by the anesthetic conserving device in critically ill patients. *Intensive Care Med* 35:1240-1246.
29. Bisbal M, Arnal JM, Passelac A, Sallee M, Demory D, Donati SY, Granier I, Corno G, Durand-Gasselin J (2011) [Efficacy, safety and cost of sedation with sevoflurane in intensive care unit]. *Ann Fr Anesth Reanim* 30:335-341.
30. Meiser A, Laubenthal H (2005) Inhalational anaesthetics in the ICU: theory and practice of inhalational sedation in the ICU, economics, risk-benefit. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 19:523-538.
31. Enlund M, Kietzmann D, Bouillon T, Zuchner K, Meineke I (2008) Population pharmacokinetics of sevoflurane in conjunction with the AnaConDa: toward target-controlled infusion of volatiles into the breathing system. *Acta Anaesthesiol Scand* 52:553-560.

32. **Kharasch ED, Armstrong AS, Gunn K, Artru A, Cox K, Karol MD (1995) Clinical sevoflurane metabolism and disposition. II. The role of cytochrome P450 2E1 in fluoride and hexafluoroisopropanol formation. *Anesthesiology* 82:1379-1388.**
33. **Kharasch ED, Jubert C (1999) Compound A uptake and metabolism to mercapturic acids and 3,3,3-trifluoro-2-fluoromethoxypropanoic acid during low-flow sevoflurane anesthesia: biomarkers for exposure, risk assessment, and interspecies comparison. *Anesthesiology* 91:1267-1278.**
34. **Higuchi H, Sumikura H, Sumita S, Arimura S, Takamatsu F, Kanno M, Satoh T (1995) Renal function in patients with high serum fluoride concentrations after prolonged sevoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 83:449-458.**
35. **Cousins MJ, Mazze RI (1973) Methoxyflurane nephrotoxicity. A study of dose response in man. *JAMA* 225:1611-1616.**
36. **Gonsowski CT, Laster MJ, Eger EIn, Ferrell LD, Kerschmann RL (1994) Toxicity of compound A in rats. Effect of increasing duration of administration. *Anesthesiology* 80:566-573.**
37. **Obata R, Bito H, Ohmura M, Moriwaki G, Ikeuchi Y, Katoh T, Sato S (2000) The effects of prolonged low-flow sevoflurane anesthesia on renal and hepatic function. *Anesth Analg* 91:1262-1268.**

Legends

Table 1: The amounts of sevoflurane absorbed by the pulmonary route, by time of inhalation. (sd: standard deviation; rsd: relative standard deviation).

Table 2: Pharmacokinetic parameters. Distribution volume (V_{dis}); Elimination constant (K_{el}); transfer constant from compartment 1 to compartment 2 (K_{1-2}); half-life of elimination ($T_{1/2}$); and total clearance.

Figure 1: Individual plasma sevoflurane levels in the 12 patients over time.

Figure 2: End-tidal sevoflurane concentrations (empty triangles) and sevoflurane wash-out kinetics (empty squares). Means \pm standard deviations are shown. n=12 during the wash-out phase (after cessation of inhalation).

Figure 3: Serum urea and creatinine levels over the 7 days after commencement of sedation.

Table 1.

	0-5 min	5-10 min	10 min-1 h	1-6 h	6-24 h	24-48 h	Total
Mean volume of sevoflurane injected (ml)	2,0	1,7	9,3	45,3	159,6	186,5	404,3
Mean volume of sevoflurane injected -10% (the loss) (ml)	1,8	1,5	8,4	40,8	143,6	167,8	363,9
Mean weight of sevoflurane injected-10% (the loss) (g)	2,6	2,2	12,4	60,1	211,5	247,2	536,0
sd (g)	0,9	0,9	3,5	13,9	34,2	53,0	89,5
rsd (%)	35%	41%	28%	23%	16%	21%	17%

Table 2

Vdis (l)	Kel (h ⁻¹)	K1-2 (h ⁻¹)	K2-1 (h ⁻¹)	T _{1/2} (h)	Cl (l/h)
53	2,9	1,2	0,26	3,78	156

Figure 1:

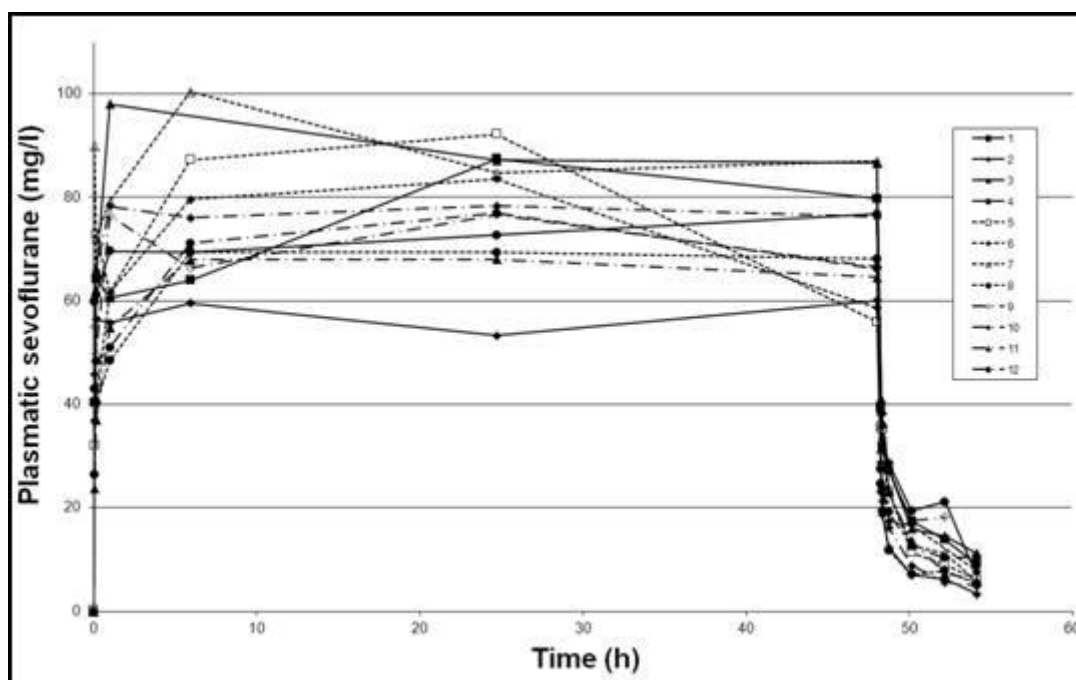


Figure 2:

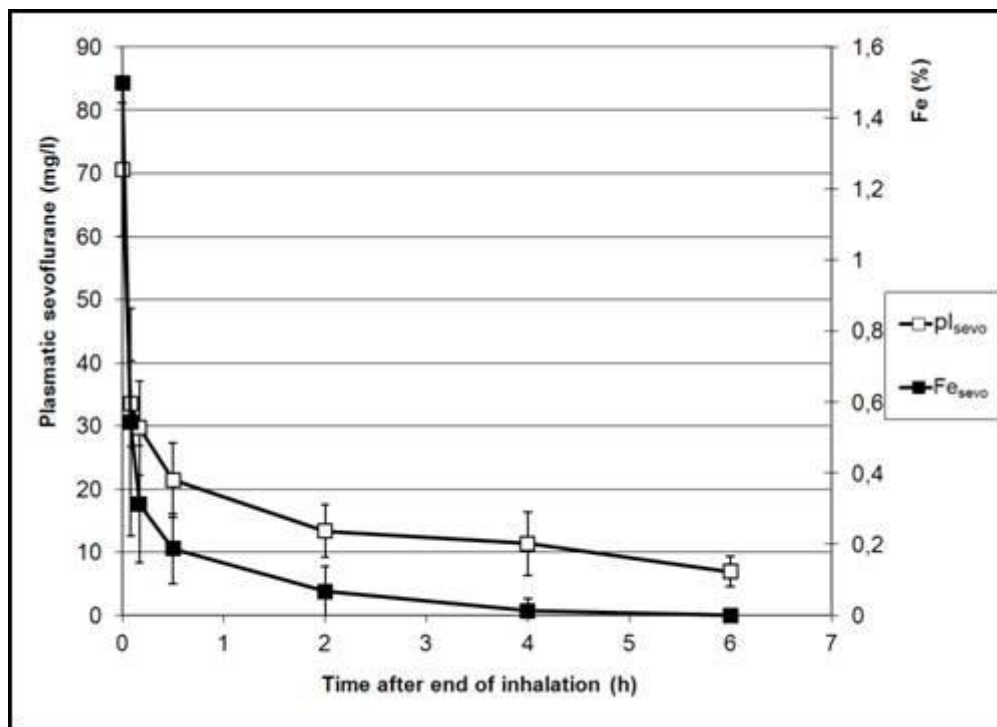
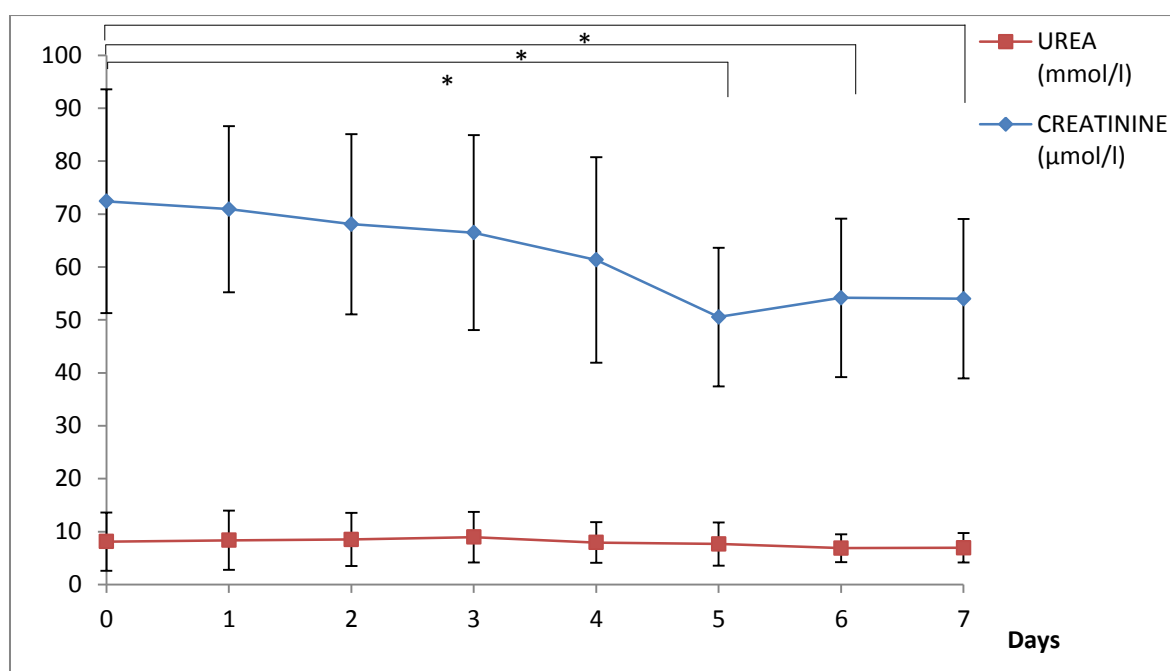


Figure 3 :



Auteur : Daniel Bourdeaux

Thèse pour le Doctorat d'Université (Université d'Auvergne – Université Blaise Pascal)

Spécialité : Pharmacie Clinique

Résumé :

L'utilisation du sévoflurane comme hypnotique par voie inhalée pour sédation en réanimation est restée pendant longtemps confidentielle et ce pour deux raisons principales : l'antériorité de l'utilisation et donc la connaissance parfaite des protocoles par voie intraveineuse (benzodiazépines ou propofol) ainsi que l'adéquation des respirateurs aux protocoles d'anesthésie et non à la sédation. L'apparition de l'Anaesthetic Conserving Device (AnaConDa ou ACD), en se substituant à l'échangeur de chaleur et d'humidité sur le circuit respiratoire a permis le développement de protocoles de sédation utilisant les gaz halogénés à de faibles doses sur des périodes beaucoup plus longues que celles définies par son Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en anesthésie. Du fait de ses propriétés (faible volume de distribution, cinétique rapide, protection cardio-vasculaire) le sévoflurane est préféré aux protocoles intraveineux dans certaines indications. Ainsi, le CHU de Clermont-Ferrand s'est porté promoteur d'une étude clinique étudiant l'influence de longues périodes d'administration avec le filtre AnaConDa sur le comportement cinétique du gaz et la tolérance rénale des patients traités.

Nous avons développé une méthode de dosage plasmatique par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse du gaz et de son métabolite et établi un protocole d'étude des paramètres pharmacocinétiques les plus déterminants de cette administration. 12 patients ont été inclus dans l'essai clinique.

Les paramètres pharmacocinétiques calculés montrent que cette administration ne semble pas modifier la cinétique du sévoflurane par rapport à une administration classique du gaz sur de plus courtes périodes. Par ailleurs, la tolérance rénale des patients inclus est bonne. Ces résultats sont à confirmer par l'étude d'un plus grand nombre de patients en prenant en compte les populations particulières de malades tels que les obèses ou les insuffisants rénaux.

Mots clés : Sévoflurane, HFIP, sédation, réanimation, étude clinique, pharmacocinétique, AnaConDa

Jury :

Président : M. Jean-Etienne Bazin PU-PH Clermont-Ferrand

Membres : M. Jean Chopineau PU-PH Clermont-Ferrand, Directeur

Mme. Valérie Sautou MCU-PH Clermont-Ferrand, Directeur

M. Antoine Dupuis MCU-PH Poitiers

Rapporteurs: Mme. Marie-Claude Saux PU-PH Bordeaux

M. Gilles Aulagner PU-PH Lyon

Date de soutenance : Mercredi 14 Novembre 2012